

# Analytik von Proteinen in der Kapillarelektrophorese

Untersuchung des Adsorptionsverhaltens  
unter Berücksichtigung statistischer Aspekte  
und Entwicklung anti-adhesiver Strategien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig



zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

**Michael Graf**

aus Korbach

1. Referent: Prof. Dr. H. Wätzig

2. Referent: Prof. Dr. R. Daniels

Eingereicht am: 09.01.2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.04.2006

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig

für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

Ferner gilt mein Dank sowohl meinen Arbeitskreiskollegen, Phillip Hasemann, Heidi Köppel, Jens Ohnesorge, Sami El Deeb, Udo Schepers und Simone Schröder als auch meinem ehemaligen Kollegen, Julia Hille, Matthias Loa und Dr. Stefan Günter.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Korrekturlesern meiner Arbeit bedanken, insbesondere bei Frau Maren Biedenweg und Herrn Tim Klundt.

Weiterhin möchte ich noch die technische Unterstützung nicht unerwähnt lassen durch die Herrn Beyerlein, Looft<sup>†</sup> und Warren von Unicam Chromatography, Kassel, das technische Personal des Institutes für Pharmazeutische Chemie, insbesondere die Herrn Hartmann und Roese, sowie die Firmen Prince Technologies (Emmen, NL) und Polymicro Technologies LLC (Phoenix, AZ, USA). Besonderen Dank gilt auch Herrn Dr. Henning Bubert am Institut für Spektroskopie und angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund für die Kooperation bei den röntgenphotoelektronenspektroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Kapillarchargen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels für die Übernahme des Koreferates.

---

---

## Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

H. Wätzig, J. Hille, J. Ohnesorge, M. Graf  
Dem Proteom auf der Spur  
Pharmazeutische Zeitung 147(8), 560-565 (2002)

H. Wätzig, S. Kaupp, M. Graf  
Inner surface properties of capillaries for electrophoresis  
Trends Anal. Chem., 22(10), 588-604 (2003)

M. Graf, R. G. Garcia, H. Wätzig  
„Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries“  
Electrophoresis 2005, 26, 12, 2409–2417

M. Graf, H. Wätzig  
„Capillary isoelectric focusing - reproducibility and protein adsorption“  
Electrophoresis 2004, 25, 17, 2959–2964

### Tagungsbeiträge

M. Graf, S. Kaupp, H. Bubert, H. Wätzig  
Chemical surface properties of fused silica capillaries and their consequences for reproducibility and Robustness in CE“ (Vortrag)  
3. EGSM, 23.-25.2.2001, Frankfurt am Main

M. Graf, H. Wätzig  
„Capillary isoelectric focusing - reproducibility and protein adsorption“ (Poster)  
Jahrestagung der DPhG, 08.-11.10.2003, Würzburg

M. Graf, H. Wätzig  
„Capillary isoelectric focusing - reproducibility and protein adsorption“ (Poster)  
17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis, 08.-12.2.2004, Salzburg

M. Graf, R. G. Garcia, H. Wätzig  
„Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries“ (Poster)  
17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis, 08.-12.2.2004, Salzburg

---

M. Graf, R. G. Garcia, H. Wätzig

„Proteinadsorption in unbeschichteten und Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren“  
(Vortrag)

Doktorandentagung der DPhG, 24.-26.03.2004, Freudenstadt-Lauterbad

M. Graf, R. G. Garcia, H. Wätzig

„Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries“ (Poster)  
Jahrestagung der DPhG, 07.-10.10.2004, Regensburg

---

Für meine Familie und meine Freunde

---



---

In Memoriam

Alexander Rubitschek

---

---

„Es war ein langer, langer Weg  
und niemand sagte, es wird leicht,  
doch es wird Zeit, daß man ihn geht.“

Stefan Weidener

---

---

## Abkürzungen, Konstanten und Symbole

### Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AUC	Peakfläche (area under the curve)
CD	Circulardichroismus-Spektroskopie (circular dichroism)
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
CEC	Kapillarelektrochromatographie (capillary electrochromatography)
CGE	Kapillargelelektrophorese (capillary gel electrophoresis)
CIEF	kapillarisoelektrische Fokussierung (capillary isoelectric focusing)
CZE	Kapillarzonenlektrophorese
DSC	Differenzialrasterkalorimetrie (differential scanning calorimetry)
EDL	Elektrochemische Doppelschicht (electric double layer)
EOF	elektroosmotischer (bzw. endoosmotischer) Fluß
EPDMA	Epoxypolydimethylacrylamid
FTIR	Fourier transformierte Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance chromatography)
I.D.	Innendurchmesser (inner diameter)
i.H.p.	starre Doppelschicht (inner Helmholtz plane)
IP	isoelektrischer Punkt
IS	interner Standard
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz (laser induced fluorescence)
LOD	Detektionsgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
LPA	lineares Polyacrylamid
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
O.D.	Außendurchmesser (outer diameter)
o.H.p.	diffuse Doppelschicht (outer Helmholtz plane)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlußchromatographie)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Triethanolamin
XPS	Röntgen induzierte Photoelektronenspektroskopie (x-ray photoelectron spectroscopy)

---

## Konstanten und Symbole

$\mu_{\text{app}}$	scheinbare Mobilität [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$\mu_{\text{EOF}}$	elektroosmotische Mobilität [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
AU	Peakfläche [AU·min]
korr. AU	korrigierte Peakfläche [AU]
$\beta$	Dicke Gouy-Chapman-Schicht [m]
$c_i$	Stoffmengenkonzentration [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
E	Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$e_0$	Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{A} \cdot \text{s}$ ]
$\varepsilon_i$	molarer Absorptionskoeffizient von i in [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante des Mediums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
$\varepsilon_{\text{rel}}$	Relative Dielektrizitätskonstante
F	Faraday-Konstante = $N_A \cdot e_0$ [96485,3 C·mol <sup>-1</sup> ]
$F_R$	Stokesche Reibungskraft [N]
$\eta$	dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
I	Stromstärke [A]
$I_0$	Lichtintensität des Referenzstrahls
$I_P$	Lichtintensität des Probenstrahls
$I_i$	Ionenstärke [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$\kappa$	Debye-Hückel-Parameter [ $\text{m}^{-1}$ ]
$k_B$	Boltzmann Konstante $N_A \cdot F$ [ $1,38065 \cdot 10^{-23} \text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ ]
$L_{\text{Det}}$	effektive Kapillarlänge [cm]
$l_{\text{ges}}$	(gesamte) Kapillarlänge [cm]
mM	millimolar [ $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$N_A$	Avogadrosche Zahl [ $6,022 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$ ]
$v_i$	Migrationsgeschwindigkeit von i [ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$Q_{\text{Eff}}$	Effektive Teilchenladung
$\underline{\theta}$	untere Intervallgrenze
$\overline{\theta}$	obere Intervallgrenze
R	allg. Gaskonstante [ $8,31447 \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$r_i$	Teilchenradius von i [cm]
sinh (x)	Sinus hyperbolicus von x
T	Temperatur [K]
$t_{\text{Mig}}$	Migrationszeit [min]
U	Spannung [V]
$\zeta$	Zetapotential [mV]
$z_i$	Ladungszahl der Spezies i



---



---

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	i
Veröffentlichungen.....	iii
Abkürzungen, Konstanten und Symbole.....	xi
Inhaltsverzeichnis.....	xiii
1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....	1
1.1.1 Allgemeine Aspekte.....	1
1.1.2 Proteinanalytik.....	2
1.1.3 CE-Systeme.....	2
1.1.4 UV-Detektion.....	3
1.1.4.1 Empfindlichkeit und Signal/Rausch-Verhältnis.....	4
1.1.4.2 Datenanalyse.....	6
1.1.5 Probeninjektion.....	7
1.1.5.1 Hydrostatische / hydrodynamische Injektion.....	7
1.1.5.2 Elektrokinetische Injektion.....	8
1.2 Grundprinzip der Kapillarzonenoelektrophorese (CZE).....	9
1.2.1 Trennprinzip.....	9
1.2.2 Einfluß des Elektroosmotischen Flusses (EOF).....	10
1.2.3 Feldstärke.....	10
1.3 Prinzip der Kapillarisoelektrischen Fokussierung (CIEF).....	11
1.3.1 Trennprinzip.....	11
1.3.2 Mobilisierung.....	13
1.3.2.1 Chemische Mobilisierung.....	13
1.3.2.2 Hydrodynamische Mobilisierung.....	13
1.4 Theoretische Grundlagen.....	14
1.4.1 Migrationsgeschwindigkeit.....	14
1.4.2 Elektrophoretische Mobilität.....	15
1.4.3 Effektive elektrophoretische Mobilität.....	15
1.4.4 $\zeta$ -Potential.....	16
1.4.5 Elektroosmotischer Fluß (EOF).....	21
1.4.5.1 Strömungsprofile.....	21
1.4.5.2 EOF-Marker.....	22
1.5 Kapillaren.....	23
1.5.1 Kapillartypen.....	23
1.5.2 Konditionierung.....	23
1.5.3 Äquilibrierung.....	24
2 Aufgabenstellung.....	25
3 Oberflächenchemie der Kapillaren.....	27
3.1 Herstellung.....	27
3.2 Untersuchung der Kapillaroberflächen.....	30
3.2.1 Röntgenstrahlphotoelektronenspektroskopie – XPS.....	30
3.2.1.1 Theorie der XPS.....	30
3.2.1.2 Möglichkeiten und Grenzen der XPS.....	31
3.2.1.3 Experimentelle Daten.....	31
3.2.1.4 Ursprung kovalent gebundener Kohlenstoffverbindungen.....	33

---

3.3 Beschichtungen.....	35
3.3.1 Einteilung der Beschichtungen.....	35
3.3.2 Dynamische Beschichtungen.....	36
3.3.2.1 Hochmolekulare Modifier.....	36
3.3.2.2 Niedermolekulare Modifier.....	37
3.3.2.3 Effizienz dynamischer Beschichtungen.....	38
3.3.3 Kovalente Beschichtungen.....	38
3.3.3.1 Oberflächenaktivierung.....	39
3.3.3.2 Organosilanylation.....	40
3.3.3.3 Chlorierung und Grignardierung.....	40
3.3.3.4 Hydrosilation.....	41
4 Kapillarisoelektrische Fokussierung.....	43
4.1 Allgemeine Aspekte.....	43
4.1.1 Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit.....	44
4.1.2 Stabilität der Beschichtung.....	45
4.1.3 Proteinkonzentration und Empfindlichkeit.....	47
4.1.4 Optimierung der Wellenlänge.....	47
4.2 Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit.....	48
4.2.1 Konventionelle CIEF-Methode.....	48
4.2.2 Optimierung der CIEF-Methode.....	49
4.2.2.1 Gerätebedingte Modifikationen.....	49
4.2.2.2 Reduktion der Proteinmengen.....	52
4.2.3 Vergleich mit chemischer Mobilisierung.....	54
4.3 Ergebnisse und Diskussion.....	56
5 Kapillarzonenoelektrophorese (CZE).....	59
5.1 Aspekte der Proteinanalytik.....	59
5.1.1 Allgemeines.....	59
5.1.2 Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit.....	60
5.1.3 Zielstellung.....	61
5.1.3.1 Der Elektroosmotische Fluß – eine zentrale Größe.....	61
5.1.3.2 Systemimmanente Einflüsse.....	62
5.1.3.3 Taylor-Aris-Dispersion.....	63
5.2 CZE-Methode.....	64
5.2.1 Dreiphasige Methode zur Analytik von Proteinen.....	65
5.2.2 Statistischer Ansatz.....	66
5.2.3 Auswahl der Testsubstanzen.....	68
5.2.4 Puffersysteme.....	69
5.2.4.1 Gerätebedingte Faktoren.....	70
5.2.4.2 Proteinimmanente Faktoren.....	71
5.2.5 Herstellung der Puffer und Lösungen.....	72
5.3 Cytochrom C – ein basisches Globulin.....	74
5.3.1 Untersuchungen bei pH 7,0.....	74
5.3.2 Untersuchungen bei pH 8,4.....	76
5.3.3 Untersuchungen bei pH 9,2.....	79
5.3.4 Untersuchungen bei pH 10,5.....	83
5.3.5 Untersuchungen bei pH 11,0.....	88
5.3.6 Untersuchungen bei pH 11,5.....	90
5.3.7 Zusammenfassung und Diskussion.....	92

---

---

5.4 Catalase – ein Homotetramer.....	100
5.4.1 Standardmethode.....	100
5.4.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0.....	100
5.4.1.2 Untersuchungen bei pH 5,5.....	103
5.4.1.3 Untersuchungen bei pH 6,0.....	105
5.4.1.4 Untersuchungen bei pH 6,5.....	107
5.4.1.5 Untersuchungen bei pH 7,0.....	109
5.4.1.6 Untersuchungen bei pH 8,0.....	110
5.4.1.7 Untersuchungen bei pH 9,2.....	112
5.4.1.8 Diskussion der Teilergebnisse.....	114
5.4.2 Einfluß der Pufferzusammensetzung.....	121
5.4.2.1 Borat-Puffer – reduzierte Proteinmenge.....	121
5.4.2.2 Phosphat-Puffer.....	123
5.4.2.3 Borat-Phosphat-Puffer.....	125
5.4.2.4 Diskussion der Teilergebnisse.....	128
5.5 $\beta$ -Lactoglobulin – ein saures, dimeres Protein.....	134
5.5.1 Untersuchungen in unbeschichteten Kapillaren.....	135
5.5.1.1 Acetat-Puffer pH 5,0.....	135
5.5.1.2 Phosphat-Puffer - pH 6,0.....	138
5.5.1.3 Phosphat-Puffer - pH 6,5.....	142
5.5.1.4 Phosphat-Puffer - pH 7,0.....	147
5.5.1.5 Phosphat-Puffer - pH 8.....	149
5.5.1.6 Borat-Puffer – pH 8,4.....	151
5.5.1.7 Borat-Puffer - pH 9,2.....	153
5.5.2 Diskussion der Teilergebnisse in unbeschichteten Kapillaren.....	155
5.5.2.1 Vergleich der Resultate von filtrierter und unfiltrierter Lösung.....	155
5.5.2.2 Stabilität der Proteinstruktur.....	161
5.6 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren.....	165
5.6.1 Untersuchung des EOF in beschichteten Kapillaren.....	165
5.6.1.1 Allgemeine Aspekte.....	165
5.6.1.2 Präzision in Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren.....	166
5.6.2 Tagespräzision - Einmaliger Gebrauch.....	170
5.6.2.1 Untersuchungen bei pH 5,3 bzw. 5,5.....	171
5.6.2.2 Untersuchungen bei pH 6,0.....	174
5.6.2.3 Untersuchungen bei pH 6,5.....	177
5.6.2.4 Untersuchungen bei pH 7,0.....	180
5.6.2.5 Diskussion der Teilergebnisse.....	183
5.6.3 Langzeituntersuchungen an beschichteten Kapillaren.....	186
5.6.3.1 Untersuchungen bei pH 6,5.....	187
5.6.3.2 Untersuchungen bei pH 7,0.....	189
5.6.3.3 Untersuchungen bei pH 6,0.....	193
5.6.3.4 Untersuchungen bei pH 6,5 – Langzeitmeßreihe.....	196
5.6.3.5 Integration von Spülschritten.....	199
5.6.3.6 Diskussion der Teilergebnisse.....	203
5.7 Myoglobin – ein kleines, neutrales Protein.....	206
5.7.1 Standardmethode.....	206
5.7.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0.....	206

---

---

5.7.1.2 Untersuchungen bei pH 5,5.....	209
5.7.1.3 Untersuchungen bei pH 6,0.....	211
5.7.1.4 Untersuchungen bei pH 6,5.....	213
5.7.1.5 Untersuchungen bei pH 7,0.....	215
5.7.1.6 Untersuchungen bei pH 8,0.....	218
5.7.1.7 Untersuchungen bei pH 8,4.....	219
5.7.1.8 Untersuchungen bei pH 9,2.....	221
5.7.1.9 Diskussion der Teilergebnisse.....	223
5.7.2 Myoglobin – weiterführende Untersuchungen.....	228
5.7.2.1 Untersuchungen bei pH 5,0 – taxigene Einflüsse.....	228
5.7.2.2 Untersuchungen bei pH 5,3 – taxigene Einflüsse.....	231
5.7.2.3 Untersuchungen bei pH 6,4 – Desorption mit SDS.....	233
5.7.2.4 Untersuchungen bei pH 7,0 – Ionenstärke.....	238
5.7.2.5 Untersuchungen bei pH 9,2 – Desorption mit SDS.....	240
5.7.2.6 Untersuchungen bei pH 8,4 und 9,2 – Innendurchmesser.....	244
5.7.2.7 Diskussion der Teilergebnisse.....	248
5.8 Ovalbumin – ein Glykoprotein.....	254
5.8.1 Standardmethode.....	255
5.8.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0.....	255
5.8.1.2 Untersuchungen bei pH 6,0.....	257
5.8.1.3 Untersuchungen bei pH 6,5.....	264
5.8.1.4 Untersuchungen bei pH 7,0.....	266
5.8.1.5 Untersuchungen bei pH 8,4.....	269
5.8.1.6 Untersuchungen bei pH 9,2.....	271
5.8.1.7 Diskussion der Teilergebnisse.....	273
5.8.2 Dialyse Ovalbumin.....	279
5.8.2.1 Untersuchungen bei pH 6,0.....	280
5.8.2.2 Untersuchungen bei pH 6,5.....	284
5.8.2.3 Diskussion der Teilergebnisse.....	286
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	293
7 Experimenteller Teil.....	297
7.1 Instrumentierung.....	297
7.1.1 Geräte.....	297
7.1.2 Software.....	297
7.2 Kapillaren.....	297
7.3 Reagenzien und Chemikalien.....	298
7.4 Lösungen und Puffer.....	299
7.5 Dialyse.....	301
7.6 Kapillarisoelektrische Fokussierung.....	301
7.6.1 Herstellung von Ampholyt-, Blind- und Probenlösungen.....	301
7.6.2 Arbeitsvorschrift für CIEF-Experimente.....	302
8 Literaturverzeichnis.....	305
9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen.....	A1
9.1 Catalase.....	A1
9.1.1 Catalase pH 5,00.....	A1
9.1.2 Catalase pH 5,50.....	A2
9.1.3 Catalase pH 6,00.....	A2
9.1.4 Catalase pH 6,50.....	A3

---

9.1.5 Catalase pH 7,00.....	A4
9.1.6 Catalase pH 8,00.....	A5
9.1.7 Catalase pH 9,20.....	A6
9.1.8 Catalase pH 9,20.....	A7
9.1.9 Catalase pH 9,20.....	A8
9.1.10 Catalase pH 9,17.....	A8
9.1.11 Catalase pH 9,19.....	A9
9.2 Cytochrom C.....	A11
9.2.1 Cytochrom C pH 7,00.....	A11
9.2.2 Cytochrom C pH 8,40.....	A11
9.2.3 Cytochrom C pH 8,40.....	A12
9.2.4 Cytochrom C pH 9,20.....	A13
9.2.5 Cytochrom C pH 10,50.....	A14
9.2.6 Cytochrom C pH 11,00.....	A15
9.2.7 Cytochrom C pH 11,50.....	A15
9.3 $\beta$ -Lactoglobulin ohne Filtration.....	A17
9.3.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,00.....	A17
9.3.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00.....	A17
9.3.3 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00.....	A18
9.3.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A19
9.3.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00.....	A20
9.3.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 8,40.....	A21
9.4 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren 1.....	A22
9.4.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A22
9.4.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00.....	A22
9.4.3 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A23
9.4.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A24
9.4.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00.....	A24
9.4.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A25
9.5 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren 2.....	A27
9.5.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,50.....	A27
9.5.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,25.....	A27
9.5.3 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00.....	A28
9.5.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,08.....	A29
9.5.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A30
9.5.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A31
9.5.7 $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00.....	A31
9.6 $\beta$ -Lactoglobulin.....	A33
9.6.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,00.....	A33
9.6.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00.....	A34
9.6.3 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50.....	A34
9.6.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00.....	A35
9.6.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 8,00.....	A36
9.6.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 9,20.....	A37
9.7 Myoglobin – weiterführende Untersuchungen.....	A39
9.7.1 Myoglobin pH 5,25.....	A39
9.7.2 Myoglobin pH 5,25.....	A39

---

---

9.7.3 Myoglobin pH 5,25.....	A40
9.7.4 Myoglobin pH 5,00.....	A40
9.7.5 Myoglobin pH 5,00.....	A41
9.7.6 Myoglobin pH 5,00.....	A42
9.7.7 Myoglobin pH 5,00.....	A42
9.7.8 Myoglobin pH 6,40.....	A43
9.7.9 Myoglobin pH 6,40.....	A44
9.7.10 Myoglobin pH 6,40.....	A44
9.7.11 Myoglobin pH 7,00.....	A45
9.7.12 Myoglobin pH 7,00.....	A46
9.7.13 Myoglobin pH 8,40.....	A46
9.7.14 Myoglobin pH 8,40.....	A47
9.7.15 Myoglobin pH 8,40.....	A47
9.7.16 Myoglobin pH 9,20.....	A48
9.7.17 Myoglobin pH 9,20.....	A48
9.7.18 Myoglobin pH 9,20.....	A49
9.8 Myoglobin.....	A51
9.8.1 Myoglobin pH 5,00.....	A51
9.8.2 Myoglobin pH 5,50.....	A52
9.8.3 Myoglobin pH 6,00.....	A52
9.8.4 Myoglobin pH 6,50.....	A53
9.8.5 Myoglobin pH 7,00.....	A54
9.8.6 Myoglobin pH 8,00.....	A55
9.8.7 Myoglobin pH 8,40.....	A56
9.8.8 Myoglobin pH 9,20.....	A57
9.9 Ovalbumin.....	A58
9.9.1 Ovalbumin pH 5,00.....	A58
9.9.2 Ovalbumin pH 6,00.....	A59
9.9.3 Ovalbumin pH 6,00.....	A59
9.9.4 Ovalbumin pH 6,00.....	A60
9.9.5 Ovalbumin pH 6,50.....	A61
9.9.6 Ovalbumin pH 6,50.....	A62
9.9.7 Ovalbumin pH 7,00.....	A63
9.9.8 Ovalbumin pH 8,40.....	A64
9.9.9 Ovalbumin pH 9,20.....	A64
9.10 Dialyse Ovalbumin.....	A66
9.10.1 Ovalbumin pH 6,00.....	A66
9.10.2 Ovalbumin pH 6,00.....	A67
9.10.3 Ovalbumin pH 6,50.....	A67
9.10.4 Ovalbumin pH 6,50.....	A68
9.11 EOF Untersuchung in LPA beschichteten Kapillaren.....	A70
9.11.1 Test 1 pH 7,00.....	A70
9.11.2 Test 2 pH 7,00.....	A71
9.11.3 Test 3 pH 7,00.....	A72

---

---

---



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

### 1.1.1 Allgemeine Aspekte

Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt eine moderne und leistungsfähige Analysetechnik dar, welche in den vergangenen zwei Jahrzehnten durch den instrumentellen Fortschritt stark an Bedeutung gewonnen hat [1][2]. Unter dem allgemeinen Oberbegriff Elektrophorese faßt man alle Methoden zusammen, bei denen die Trennung von geladenen Teilchen in einer Elektrolytlösung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes aufgrund unterschiedlicher Wanderungsrichtungen und/oder -geschwindigkeiten erfolgt. Um eine Gliederung der verschiedenen Analysenverfahren vornehmen zu können, werden unterschiedliche Kriterien herangezogen. Eine der grundsätzlichen Einteilungen beruht darauf, daß die Elektrolytlösung sich entweder in Trägermaterialien wie Polyacrylamidgelen, Papier- oder Cellulosefolien befindet (Trägerelektrophorese) oder in einem ausschließlich mit Flüssigkeit gefülltem Trennkompartiment wie Kapillaren oder U-Rohren (trägerfreie Elektrophorese). Weitere Gesichtspunkte, nach denen die Klassifizierung erfolgen kann, beziehen sich auf den Mechanismus, nach welchem die Analyten aufgetrennt werden. Diese Vorgehensweise korreliert nicht unerheblich mit den Einteilungen, die sich aus den chemischen Eigenschaften der Analyten ergeben.

Der Begriff Kapillarelektrophorese ist ein Oberbegriff für alle Trennverfahren, welche in zylindrischen Trennkompartimenten durchgeführt werden. Durch eine Gegenüberstellung der wichtigsten CE-Techniken wird deutlich, daß diese Katalogisierung keineswegs konform ist mit den obengenannten Ansätzen. Neben der Kapillarzonenelektrophorese (CZE), welche sich von der trägerfreien Elektrophorese nach Tiselius ableitet, gibt es weitere wichtige Verfahren wie die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC), die Kapillargelelektrophorese (CGE), die Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF) und die Isotachophorese (ITP) [3].

Die Heterogenität der subsummierten Verfahren erklärt sich teilweise dadurch, daß fast alle Verfahren sich mit dem gleichen Instrument durchführen lassen, wobei nur kleinere Modifikationen vorgenommen werden müssen. Die instrumentellen Fortschritte mit dem Einsatz von Probenwechslern und die Anbindung an EDV-gestützte

Systeme erlauben die automatisierte Steuerung des Gerätes sowie die Auswertung der einzelnen Messungen. Dadurch läßt sich außerdem der Probendurchsatz deutlich steigern und gleichzeitig der manuelle Aufwand reduzieren.

### **1.1.2 Proteinanalytik**

Die Möglichkeiten und Anforderungen der verschiedenen kapillarelektrophoretischen Verfahren sind recht unterschiedlich. Es hat sich bereits zu Beginn der 1990er Jahre herausgestellt, daß die Analytik von Proteinen mit vielfältigen Problemen zu kämpfen hat [4]. Der Grund dafür sind die unterschiedlichen Wechselwirkungen, die Proteine mit Oberflächen eingehen können [5]. Die Arten dieser Interaktionen sind genauso vielfältig wie die Eigenschaften der Proteine selbst: das Spektrum reicht von Coulomb Kräften über Wasserstoff-Brückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen bis hin zu Protein-spezifischen Bindungen wie Oligonukleotiden [6]. Eines der Hauptprobleme bei der Analytik besteht darin, daß die Mechanismen, welche zur Adsorption der Analyten an Oberflächen führen, nur wenig erforscht sind. Erschwerend kommt hinzu, daß noch nicht alle Einflußgrößen bekannt sind, welche die Stabilität von Proteinen beeinflussen. Zusätzlich wird die kapillarelektrophoretische Analytik durch die zwitterionische Natur der Proteine erschwert. Die Nettoladung des Moleküls ändert sich abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums. Der pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Analyten 0 beträgt, nennt man den isoelektrischen Punkt (IP).

Auch in vielen anderen Bereichen beobachtet man das Phänomen der Adsorption von Proteinen an Grenzflächen, z.B. im Bereich biotechnologischer Verfahren oder in der Transplantationsmedizin [7], etc. Meistens sind diese Effekte unerwünscht, in einzelnen Fällen werden sie aber auch ganz gezielt in der Entwicklung eingesetzt, um beispielsweise Enzyme auf Oberflächen von Biosensoren zu immobilisieren [8].

### **1.1.3 CE-Systeme**

Der schematische Aufbau eines CE-Systems ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Zu den wichtigsten Bauelementen gehört das Hochspannungsnetzteil, das die notwendigen Spannungen von bis zu 30 kV bei Stromstärken von maximal 200 µA bereitstellt. Die Spannung liegt an zwei Platinelektroden an, welche in die ein- bzw. auslaßseitigen, mit Pufferlösung gefüllten Gefäße eintauchen (auf die Kapillaren wird detaillierter in Kapitel 3 eingegangen). Die Polung der Elektroden läßt sich variabel einstellen: wäh-

rend im Normalfall der Platindraht im Einlaßgefäß als Anode ((+)-Pol) und der im Auslaßgefäß als Kathode ((-)-Pol) geschaltet ist, kann es bei verschiedenen Problemstellungen vorteilhaft sein, diese umzupolen.

Der Stromkreis wird durch die Kapillare geschlossen, die eine Verbindung zwischen den Flüssigkeitsreservoiren herstellt. Die Dimensionen variieren gerätebedingt. Die Gesamtlänge der Polyimid-beschichteten Kieselglaskapillaren kann zwischen 30 und 100 cm betragen. Der Außendurchmesser (O.D.) bewegt sich im Bereich von 150 bis 375  $\mu\text{m}$ . Der Innendurchmesser (I.D.) liegt typischerweise zwischen 20 und 100  $\mu\text{m}$ . Die Kapillare selbst befindet sich in einem thermisch gekapselten Bereich des CE-Gerätes, der es erlaubt, die Elektrophorese unter isothermen Bedingungen durchzuführen und die Joulesche Wärme über luft- oder flüssigkeitsgekühlte Systeme abzuführen. Die Detektion der Analyten kann entweder online (während der Trennung) oder selten offline erfolgen. Für gewöhnlich befindet sich der Detektor bei Online-Systemen etwa 10 bis 15 cm vom einlaßseitigen Ende der Kapillare entfernt, wobei an dieser Stelle ein Detektionsfenster durch Entfernen der Polyimidbeschichtung geschaffen wird. Zur Online-Detektion verwendet man fast ausschließlich optische Methoden. In der Proteom-Analytik ist die Anbindung an Massenspektrometer relativ verbreitet.

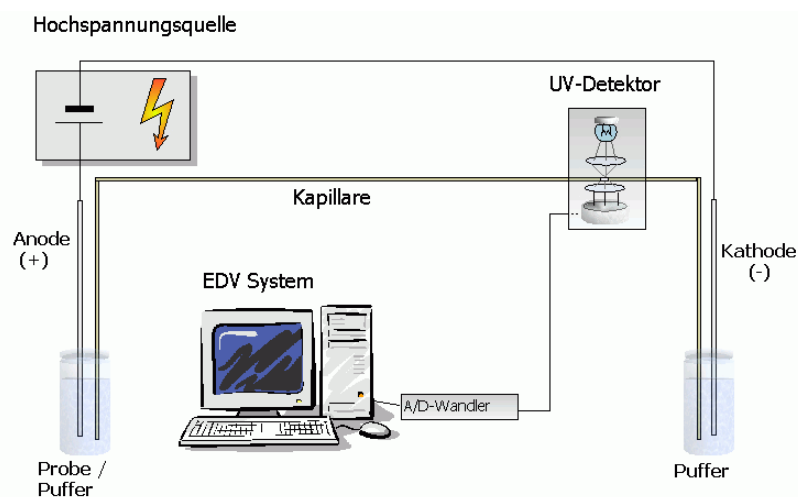


Abbildung 1.1: Schema einer CE

### 1.1.4 UV-Detektion

Die weiteste Verbreitung haben UV/Vis-Detektoren, wie sie beispielsweise auch in der HPLC verwendet werden. Allerdings werden in der CE wesentlich höhere Anforderungen an die optischen Systeme gestellt, da das Lambert-Beersche Gesetz uneingeschränkt Gültigkeit hat (Gl. 1):

$$A(\lambda) = \frac{I_0}{I_p} = \varepsilon_i \cdot c \cdot d \quad \text{(Gl. 1).}$$

- $A(\lambda)$ : Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda$   
 $I_0$ : Lichtintensität des Referenzstrahles  
 $I_p$ : Lichtintensität des Probenstrahles  
 $\varepsilon_i$ : molarer Absorptionskoeffizient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]  
 $c$ : molare Konzentration des Analyten [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]  
 $d$ : Schichtdicke der absorbierenden Lösung [cm]

Das Hauptproblem ist dabei die Kapillare, welche auch als Küvette fungiert. Zum einen beträgt die Schichtdicke im Fall einer 50  $\mu\text{m}$  Kapillaren nur ein Zweihundertstel im Vergleich zu einem Photometer bzw. ein Zehntel im Vergleich zu einer HPLC-Durchflußzelle. Zum anderen resultieren aus der kreisförmigen Geometrie der Kapillaren Probleme bei der Fokussierung des Strahlengangs. Um die Lichtstreuung zu minimieren, versucht man die Lichtquanten bei Breitband-Strahlengeräten durch Aperturen und Linsensysteme so zu bündeln, daß die parallelen Lichtwellen senkrecht zur Kapillarachse einfallen und durch die Lichtbrechung an den Kapillargrenzflächen möglichst auf das Kapillarlumen fokussiert werden (Abb. 1.2, [3]). Unter diesen Voraussetzungen vermindert man zwar die Ausbeute an Lichtquanten, welche den Detektor erreichen, erzielt aber Vorteile dadurch, daß die Lichtstrahlen relativ scharf gebündelt auf den Photomultiplier treffen.

### 1.1.4.1 Empfindlichkeit und Signal/Rausch-Verhältnis

Migriert ein Analyt im Bereich des Detektionsfensters durch den Strahlengang, nimmt die Lichtintensität am Photomultiplier ab. Durch die Anordnung von Aperturen im Lichtweg erreicht man, daß die Intensität  $I_p$  stärker abnimmt als bei Systemen ohne dieses Bauelement. Der Verzicht auf eine Apertur führt dazu, daß der gesamte Lichtstrahl auf die Kapillare trifft, und ein Teil der Lichtquanten durch den Kieselglaskörper durchtreten, ohne aber die eigentliche Küvette zu passieren. Folglich werden höhere Lichtintensitäten am Detektor registriert, die sich ungleichmäßig über ein breites Areal verteilen (Abb. 1.2, c).

In den Fällen a) und b) in Abbildung 1.2 wird die Empfindlichkeit verbessert, indem man die Grundintensität der transmittierten Lichtquanten am Photomultiplier vermindert. Durch den Einsatz von Aperturblenden erreicht man, daß ein schmaler, gebündelter Lichtstrahl auf die Lösung in der Kapillare fällt. Dies geht allerdings auf Kosten

einer geringeren Ausbeute an Lichtquanten am Photomultiplier. Durch den besser fokussierten Strahlengang erreicht man jedoch, daß die im Vergleich zu Systemen ohne Blenden niedrigere Gesamtintensität auf ein kleineres Areal des Lichtsensors fokussiert wird. Beim Durchtritt von Analyten durch das Detektorfenster beobachtet man eine stärkere Abnahme der Lichtintensität IP, so daß der Unterschied zwischen der Grundabsorption des Hintergrundelektrolyten und der Absorption durch den Analyten größer wird.

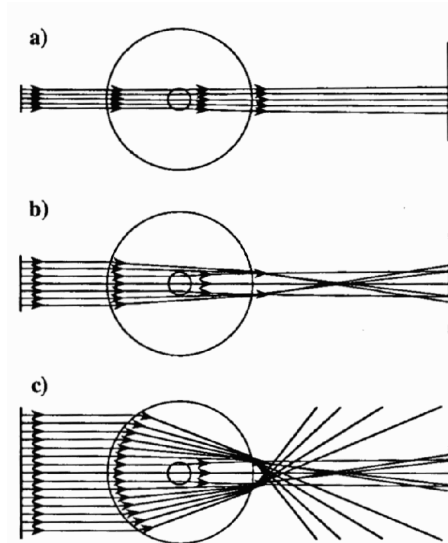


Abbildung 1.2: Fokussierung des Probenstrahls aus [3]

Im Zusammenhang mit der Empfindlichkeit und dem Signal/Rausch-Verhältnis kommt der verwendeten Wellenlänge große Bedeutung zu. Proteine weisen im Bereich von 200-210 nm etwa 50-100 fach höhere Absorptionskoeffizienten auf als bei 280 nm [9]. Folglich verbessert die Detektion im kurzwelligen UV-Bereich die Empfindlichkeit deutlich. Dennoch müssen einige zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden. Dazu gehören die limitierenden Eigenabsorptionen des Kieselglases [10] und des verwendeten Puffers, die im Bereich von 200 nm stark zunehmen. Weiterhin kommt der Wellenlängenrichtigkeit und -konstanz des Detektors große Bedeutung zu, da kleine Schwankungen der Wellenlänge zu deutlichen Veränderungen der Absorption führen. Im Fall einer vorgegebenen Probenkonzentration ist bei der Wahl der Detektionswellenlänge die Zielsetzung entscheidend. Im kürzerwelligeren Bereich nimmt die Empfindlichkeit bei konstanter Spannung zu, jedoch nimmt gleichzeitig die Trennleistung ab. Der längerwellige Bereich hingegen bietet den Vorteil, daß bei gleicher Auflösung der Peaks kürzere Analysenzeiten erreicht werden können.

Besonders in der CIEF sind Empfindlichkeitsverbesserungen wünschenswert, da einer der limitierenden Faktoren die Fällung von Proteinen innerhalb der fokussierten Probenzonen ist. Durch Verbesserungen der Empfindlichkeit wäre es z.B. in der Routineanalytik möglich, mit niedrigeren Proteinmengen arbeiten zu können und dadurch die Stabilität und Präzision des Analysensystems zu verbessern. In der Proteom-Forschung neue Konzentrationsbereiche erschlossen werden, in denen u.a. zahlreiche, potentielle Signalproteine vermutet werden. Auch hier wird die Optimierung der Wellenlänge in Richtung fernes UV-Licht durch die Eigenabsorptionen der Kapillare und des Gemisches aus Trägerampholyten begrenzt. Um diese Einflüsse auf den Verlauf der Basislinie ausgleichen zu können, sind gleichzeitige Verbesserungen bei der Integrationssoftware notwendig.

### **1.1.4.2 Datenanalyse**

Die UV-Spur eines Elektropherogramms stellt typischerweise die Absorption als Funktion über die Zeit dar. Bei der elektronischen Auswertung der UV-Spur stellt die Peakfläche das Ergebnis der Integration des Meßsignals (Absorptionseinheiten) in den Grenzen von Beginn bis Ende des Peaks dar und hat folglich die Dimensionen [Response·Zeit]. Die Festlegung der Peakbegrenzungen kann nach verschiedenen Algorithmen erfolgen. Der aus der HPLC Software übernommene Ansatz geht von der 1. Ableitung des Meßsignals aus, wobei das Über- bzw. Unterschreiten eines wählbaren Grenzwertes die Peakgrenzen signalisiert. Dieser Ansatz wird den Eigenarten eines Elektropherogramms nicht gerecht, da die Basislinie im Vergleich zur HPLC ein höheres Grundrauschen aufweist. Daher sind spezielle Algorithmen entwickelt worden, die mit den vorkommenden Basislinientrends sowie hoch- und niederfrequentem Rauschen besser zu Recht kommen. Der verbreitetste Vertreter ist der Caesar-Algorithmus, bei dem durch „object subtraction“ Impulse wie Spikes durch digitale Filter eliminiert werden [11]. Ein weiterführender Ansatz der „object subtraction“ Verfahren besteht in der Umwandlung aller Datenpunkte in Spline-Funktionen. Diese lassen sich durch Einbeziehung statistischer Prüfkriterien voneinander subtrahieren, so daß Datenpunkte entweder der Basislinie oder einem Substanzpeak zugeordnet werden [12].

Da die Analyten bei der Online-Detektion in der CZE unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen (ein wesentlicher Unterschied zur HPLC, bei der die Analyten die

Detektorzelle mit einer konstanter Flußrate passieren), haben sie verschieden lange Verweilzeiten im Detektionsfenster. Für langsam migrierende Analyten ergeben sich folglich größere AUCs, weil das Meßsignal über einen größeren Zeitraum integriert wird als für solche mit höherer Mobilität. Daher wird in der CE häufig die korrigierte Peakfläche (korr. AUC) verwendet, welche als Quotient aus Peakfläche und Migrationszeit, respektive als Produkt von AUC und  $v$ , eine von der Zeit unabhängige Größe ist. Die korr. AUC bietet Vorteile bei der Auswertung von Meßserien mit schlecht reproduzierbaren Migrationszeiten.

### **1.1.5 Probeninjektion**

Die Injektion der Probenlösung kann auf unterschiedliche Arten erfolgen, wobei zunächst das Puffergefäß am Kapillareinlaß gegen die Probe ausgetauscht wird. Für die Injektion stehen prinzipiell zwei Modi zur Wahl:

- a) hydrostatisch bzw. hydrodynamisch
- b) elektrokinetisch.

#### **1.1.5.1 Hydrostatische / hydrodynamische Injektion**

Die auch als „siphoning“ bezeichnete hydrostatische Injektion beruht auf dem Prinzip der kommunizierenden Röhren. Durch Absenkung des Kapillarauslaßgefäßes um einige cm unter das Niveau des Einlaßgefäßes wird ein aliquoter Teil der Probenlösung in die Kapillare gezogen. Dieses Verfahren hat jedoch keine große Bedeutung mehr.

Die hydrodynamische Injektion setzt voraus, daß das CE-System zusätzlich mit einem Druck-/Vakuumssystem ausgestattet ist. Während das Spülen der Kapillare, beim Konditionieren mit Natronlauge oder beim Äquilibrieren (Spülen mit Puffer), keine größeren Anforderungen an die Präzision des Pumpensystems stellt, ist für die Probeninjektion durch Anlegen von Über- bzw. Unterdruck ein fein abgestuftes Regelsystem notwendig. Die Probenlösung wird durch den Aufbau eines Überdruckes über der Flüssigkeit in die Kapillare gedrückt. Das injizierte Volumen  $V_{inj}$  läßt sich mit Hilfe des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes (Gl. 2) genauso berechnen wie der daraus resultierende Volumenstrom  $Q_{Fluß}$  (Gl. 3) und die Strömungsgeschwindigkeit  $v_{hydr}$  (Gl. 4):

$$V_{inj} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8 \eta \cdot l_{ges}} \quad \text{(Gl. 2)}$$

$$Q_{\text{Fluß}} = \frac{V}{t} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4}{8\eta \cdot l_{\text{ges}}} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$v_{\text{hydr}} = \frac{Q_{\text{fluß}}}{A} = \frac{V}{t \cdot \pi \cdot r^2} = \frac{\Delta p \cdot r^2}{8\eta \cdot l_{\text{ges}}} \quad (\text{Gl. 4}).$$

$\Delta p$ : Injektionsdruck [mbar]  
 $r$ : Innenradius der Kapillare [m]  
 $t$ : Injektionszeit [s]  
 $l_{\text{ges}}$ : Kapillarlänge [m]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $v_{\text{hydr}}$ : Strömungsgeschwindigkeit [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $Q_{\text{Fluß}}$ : Volumenstrom [ $\mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $A$ : Querschnittsfläche [ $\text{mm}^2$ ]  
 $V$ : Volumen [ $\mu\text{l}$ ]

Die Reproduzierbarkeit der Peakflächen und damit der Analytenmenge hängt damit von verschiedenen Faktoren ab. Neben der Dichtigkeit des gesamten Drucksystems hängt bei hydrodynamischer Injektion das Probenvolumen davon ab, daß die Viskosität der laminar strömenden Lösung konstant bleibt. Letztere ist exponentiell abhängig von der Temperatur (Gl. 5), so daß isotherme Bedingungen notwendig sind.

$$\eta = k \cdot e^{\frac{E_A}{R \cdot T}} \quad (\text{Gl. 5})$$

$\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $k$ : Konstante [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $E_A$ : Aktivierungsenergie [ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]  
 $R$ : allg. Gaskonstante [ $8,31447 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]  
 $T$ : Temperatur [K]

Die Rampe, mit der ein Druck aufgebaut wird, ist ebenfalls wichtig für die Reproduzierbarkeit, da es bei einem zu schnellen Anstieg zu Strömungsturbulenzen kommt.

### 1.1.5.2 Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Probenaufgabe wird eine Injektionsspannung zwischen dem Probengefäß und dem Auslaßgefäß angelegt. Die Analyten migrieren in das Lumen der Kapillare, wobei sich die Probenmenge nach dem Produkt aus Zeit und Spannung ergibt. Gegenüber den anderen Methoden hat das Verfahren Vor- und Nachteile. Aufgrund der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten der Analyten entspricht die Zusammensetzung der Probe in der Kapillaren nicht derjenigen im Probengefäß. Dies kann durchaus erwünscht sein, wenn kationische Spezies aus einer komplexen Matrix analysiert werden sollen, so daß eine In-System Probenaufkonzentrierung möglich ist.



trierung erfolgt. Außerdem muß man berücksichtigen, daß die Konzentration der Analyten bei Mehrfachinjektion abnimmt, was bei kleinen Probenvolumina sehr deutlich werden kann. Im Vergleich zu den anderen Injektionsverfahren liegt somit ein systematischer Fehler vor, der berücksichtigt werden muß.

## 1.2 Grundprinzip der Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

### 1.2.1 Trennprinzip

Die Kapillarzonenelektrophorese ist ein trägerfreies Elektrophoreseverfahren und wird daher auch als FSCE (free solution capillary electrophoresis) bezeichnet. Unter dem Aspekt des Geräteaufbaus handelt es sich um ein einfaches Analysenverfahren mit hoher Trennleistung, bei dem die Analyten in einer mit Puffer gefüllten Kapillaren nach unterschiedlichen Ladungs-/Massenverhältnissen getrennt werden. Je größer dieser Quotient ist, desto schneller bewegen sich die Analyten in Richtung der Elektrode mit entgegengesetzter Ladung, während sich neutrale Substanzen nicht auftrennen lassen (vgl. Abb. 1.3).

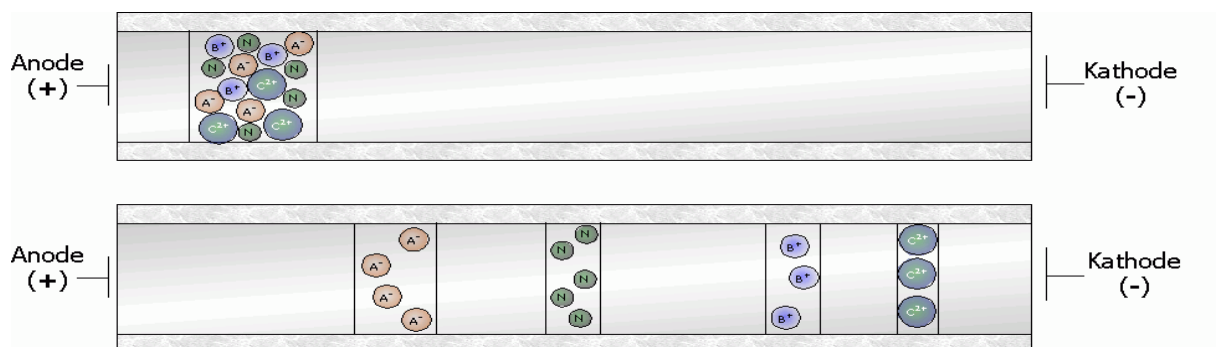


Abbildung 1.3: CZE Prinzip Trennung

Die Enden der Kapillare tauchen in die Puffergefäße ein. Die Probe (einige nl) wird durch ein geeignetes Verfahren (vgl. 1.1.5) in den proximalen Teil der Kapillare eingebracht. Durch das Anlegen einer Spannung baut sich ein elektrisches Feld auf, in dem die Analyten zu wandern beginnen. Die Reihenfolge, in der die Analyten detektiert werden, ist bei normaler Polung (einlaßseitige Anode und auslaßseitige Kathode):

1. Kationen
2. neutrale Analyten
3. Anionen.

### 1.2.2 Einfluß des Elektroosmotischen Flusses (EOF)

Die Fähigkeit, Anionen kathodenseitig detektieren zu können, setzt jedoch einen ausreichend stark ausgeprägten EOF voraus (vgl. 1.4.5 und Kapitel 3). Dieses zunächst widersprüchliche Migrationsverhalten läßt sich dadurch erklären, indem man die Migrationsgeschwindigkeiten als Vektoren in einem eindimensionalen System auffaßt.

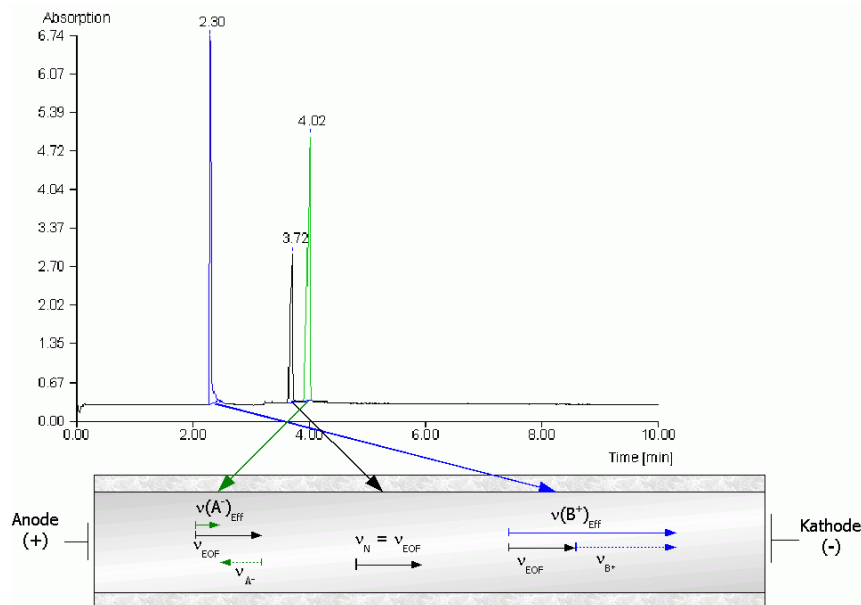


Abbildung 1.4: Vektorisierte Migrationsgeschwindigkeit

Unterscheidet sich ein Analyt von anderen hinsichtlich Betrag und/oder Richtung des Vektors, so läßt er sich von den restlichen Bestandteilen trennen (Abb. 1.4). In fast allen Kapillartypen, in Kieselglaskapillaren jedoch deutlicher als in beschichteten, beobachtet man Elektroendosmose mit einem Geschwindigkeitsvektor  $v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E$ . Dieser Vektor ist normalerweise konstant und muß zu der jeweiligen elektrophoretischen Mobilität addiert werden. In den Fällen mit  $|v_{EOF}| > |v(i)|$  werden auch Anionen entgegen ihrer Nettomobilität transportiert und gelangen so zum Detektor.

### 1.2.3 Feldstärke

Die elektrische Feldstärke ist definiert als der Quotient aus angelegter Spannung und dem Abstand zwischen den Elektroden:

$$E = \frac{U}{l_{ges}} \quad (\text{Gl. 6})$$

E: elektrische Feldstärke [ $V \cdot m^{-1}$ ]  
U: angelegte Spannung [V]  
 $l_{ges}$ : Kapillarlänge [m]

Bei der CZE geht man von einem homogenen elektrischen Feld aus, das in der Kapillare aufgebaut wird (Abb. 1.5). Diese Annahme ist deshalb wichtig, weil die in Kapitel 1.4.1 behandelte Migrationsgeschwindigkeit eine Funktion der Feldstärke ist.

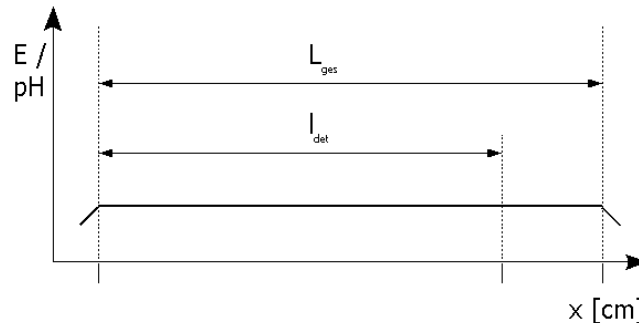


Abbildung 1.5: Plot E vs L Kapillare

Nur bei einer gleichbleibenden Feldstärke migrieren die Analyten mit konstanter Geschwindigkeit, wodurch verhindert wird, daß sich die Probenzonen in Bereichen mit niedriger Elektroendosmose durch Diffusionsprozesse verbreitern. Dies wäre gleichbedeutend mit einer Verschlechterung von Trennleistung und Reproduzierbarkeit.

## 1.3 Prinzip der Kapillarisoelektrischen Fokussierung (CIEF)

### 1.3.1 Trennprinzip

Die Kapillarisoelektrische Fokussierung ist unter den elektrophoretischen Methoden ein wichtiges Werkzeug bei der Qualitätskontrolle [13] von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln und bei der Proteom-Forschung. Zu den Vorteilen der CIEF gehört eine sehr hohe Trennleistung, weil durch den Trennmechanismus störende Diffusionsprozesse korrigiert werden. Diese Analysentechnik gehört zu der kleinen Gruppe von Verfahren, bei denen die Trennung von Substanzen aufgrund unterschiedlicher physiko-chemischer Eigenschaften erfolgt. Im Fall der CIEF sind dies nicht die elektrophoretischen Mobilitäten, sondern die isoelektrischen Punkte der zu trennenden Zwitterionen.

Die wichtigste Voraussetzung für dieses Verfahren ist ein stabiler, linearer pH-Gradient entlang des Trennkompartimentes. Dieser bildet sich aus, wenn an den Kapillarenden verdünnte Phosphorsäure als Anolyt (Einlaß) bzw. Natronlauge als Katholyt verwendet werden. Beim Anlegen einer Spannung wandern Protonen in Richtung des Kapillarauslasses, während die Hydroxidionen in Richtung des Einlaßgefäßes migrieren. In den Bereichen, wo beide Spezies aufeinandertreffen, kommt es zur Neutrali-

sation. Um den pH-Gradienten aufzubauen, füllt man die Kapillare mit einer Ampholyt-Lösung, die aus einem Gemisch von Polyaminopolycarbonsäuren besteht. Die Ampholyte weisen eine molare Masse von 300 bis 1000 Da auf und sind ihrerseits selbst zwitterionische Puffersubstanzen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten. Der pH-Gradient läßt sich durch den Zusatz von viskositäts erhöhenden Substanzen wie Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) oder Methylcellulose (MC) stabilisieren. Sie haben zusätzlich die Funktion einer dynamischen Beschichtung, welche verhindern soll, daß ein Rest-EOF den Inhalt der Kapillare mobilisiert [14].

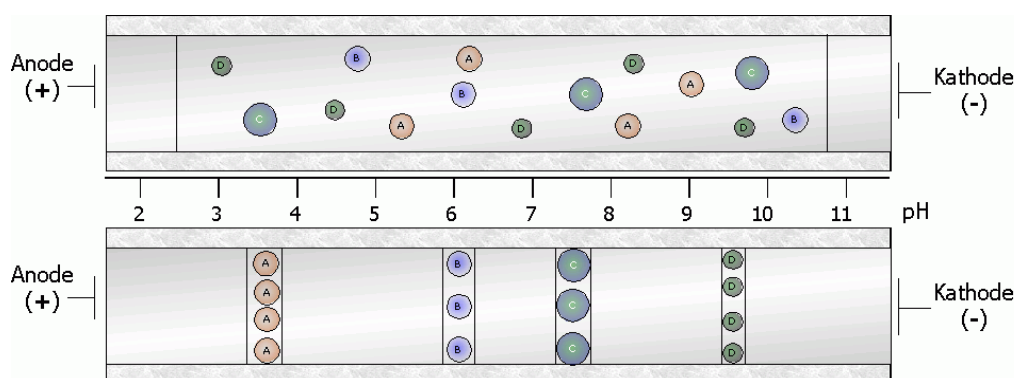


Abbildung 1.6: Prinzip der CIEF

Die Analyten werden in der ampholythaltigen Lösung solvatisiert und migrieren solange im elektrischen Feld, bis sie den pH-Bereich in der Kapillare erreichen, der ihrem isoelektrischen Punkt (IP) entspricht. An dieser Stelle erscheint das Molekül nach außen hin ungeladen, so daß keine elektrischen Kräfte mehr einwirken. Gelangt das Teilchen jedoch durch Diffusion in einen Bereich, in dem es anionisch oder kationisch geladen vorliegt, migriert es in Richtung der gegennamig geladenen Elektrode und erreicht somit wieder den Bereich der Kapillare, in dem der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Analyten entspricht. Daraus ergibt sich die Besonderheit der CIEF: es handelt sich um ein Verfahren mit hoher Trennleistung, bei der die Probenzonen durch den Trennmechanismus scharf begrenzt sind und nicht durch Diffusionsprozesse verbreitert werden (Abb. 1.6). Eine Verbesserung der Trennleistung läßt sich durch eine Verlängerung der Analysenzeiten nicht erzielen. Die so fokussierten Probenzonen verteilen sich auf die gesamte Länge der Kapillaren. In der Praxis bedeutet dies, daß sich der pH-Gradient auch über den Bereich zwischen Detektionsfenster und Kapillarauslaß erstreckt und folglich Analyten nicht detektiert werden können, die in diesem Bereich der Kapillare fokussiert werden. Dieses Problem tritt bevorzugt auf, wenn sich der pH-Gradient über wenige Einheiten erstreckt. Es läßt sich lösen, indem

der Ampholyt-Lösung eine bestimmte Menge TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin) zugesetzt wird. Als basische Verbindung liegt TEMED im Bereich zwischen der basischsten Ampholytkomponente und dem Analyten ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ ) vor und blockiert diesen Bereich der Kapillare.

### **1.3.2 Mobilisierung**

Um die Analyten detektieren zu können, ist neben dem Fokussierungsschritt ein zusätzlicher Mobilisierungsschritt erforderlich. Die Mobilisierung kann auf unterschiedliche Weisen erreicht werden. Man unterscheidet hierbei zwischen der chemischen Mobilisierung und solchen Methoden, bei denen ein Druckgradient die Flüssigkeitssäule in Richtung des Detektors bewegt.

#### **1.3.2.1 Chemische Mobilisierung**

Bei der chemischen Mobilisierung wird dem Katholyten, in der Regel 20 mM Natronlauge mit einem Zusatz von 40 bis 80 mM NaCl, ein Anion zugesetzt, welches die Hydroxidionen verdrängt und somit zu einer Verschiebung des pH-Gradienten in Richtung des Kapillarauslasses führt. Alternativ kann auch der Anolyt oder Katholyt am anderen Kapillarende durch die entsprechende Lösung ersetzt werden und somit die Mobilisierung initiieren.

#### **1.3.2.2 Hydrodynamische Mobilisierung**

Unter dem Begriff hydrodynamische Mobilisierung faßt man zwei Methoden zusammen. Ein dem Siphoning (vgl. 1.1.5.1) verwandtes Verfahren beruht darauf, daß eine Höhendifferenz zwischen Ein- und Auslaßgefäß aufgebaut wird. Die verbreitetste Variante ist aber das Anlegen von Druck auf der Einlaßseite.

Bei der Mobilisierung unterscheidet man prinzipiell zwischen Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Verfahren. Bei letzterem erfolgt die Verschiebung der Probenzonen in Richtung des Detektors nach der Fokussierung, wobei wahlweise chemisch oder hydrodynamisch mobilisiert wird. Bei der Einschritt-Methode laufen Fokussierung und Mobilisierung parallel ab, jedoch erfolgt die Konzentrierung der Analyten in den Probenzonen deutlich schneller als deren Transport in Richtung des Detektors. Bei dem Ein-Schritt Verfahren besteht zusätzlich noch die Möglichkeit, die Analyten durch einen mehr oder weniger stark ausgeprägten EOF zu mobilisieren. Prinzipiell wird dieses Verfahren in unbeschichteten Kapillaren durchgeführt. Um eine Verbreiterung der

Probenzonen durch den nicht uniformen EOF zu verhindern [15], setzt man dynamische Beschichtungen ein. Jedoch weisen auch beschichtete Kapillaren einen ausreichend ausgeprägten EOF auf.

### 1.4 Theoretische Grundlagen

#### 1.4.1 Migrationsgeschwindigkeit

Bei allen elektrophoretischen Trenntechniken liegen die Analyten als solvatisierte Partikel in einer Elektrolytlösung vor. Wird eine elektrische Spannung an den Elektroden angelegt, baut sich in der Kapillare ein elektrisches Feld auf. In diesem wirkt auf geladene Analyte eine elektrische Kraft, die proportional zur Feldstärke und zur Ladung des Teilchens ist (Gl. 7):

$$F_e = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad (\text{Gl. 7}).$$

$F_i$ : elektrophoretische Kraft [N]  
 $z_i$ : Ladungszahl von  $i$   
 $e_0$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19}$  A·s]  
 $E$ : Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

Dieser elektrischen Kraft wirken in der Flüssigkeit jedoch Reibungskräfte entgegen, die proportional zur Migrationsgeschwindigkeit und zur kinematischen (oder Newtonschen) Viskosität der Lösung sind. Aus dem Stokes'schen Gesetz läßt sich für den Proportionalitätsfaktor  $k$  unter Annahme eines sphärischen, kugelförmigen Körpers der Term  $6\pi r$  ableiten (Gl. 8):

$$F_R = k \cdot \eta \cdot v_i = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_i \quad (\text{Gl. 8}).$$

$F_R$ : kinematische Reibungskraft [N]  
 $r_i$ : Radius der Spezies  $i$  [cm]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $v_i$ : Migrationsgeschwindigkeit der Spezies  $i$  [ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $k$ : Konstante [cm]

Nach einer kurzen, initialen Beschleunigungsphase kompensiert die Reibungskraft die beschleunigende elektrische Kraft, so daß sich ein Kräftegleichgewicht einstellt und sich die Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit gemäß (Gl. 9) fortbewegen:

$$v_i^0 = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad (\text{Gl. 9}).$$

$E$ : elektrische Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $z_i$ : Ladungszahl der Spezies  $i$

$e_0$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A}\cdot\text{s}$ ]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]  
 $r_i$ : Innenradius der Kapillare [m]

Aus Gleichung 9 geht hervor, daß die Migrationsgeschwindigkeit einer Teilchenspezies von der Feldstärke  $E$  und dem Verhältnis von Ladung zu Stokes'schem Radius abhängt. Diese Gleichung besitzt prinzipiell nur Gültigkeit für unendlich verdünnte Lösungen und dient somit zur Beschreibung eines vereinfachten Modells.

### 1.4.2 Elektrophoretische Mobilität

Wie aus Gleichung 6 hervorgeht, ist die Migrationsgeschwindigkeit  $v_i$  direkt abhängig von der Feldstärke  $E$ . Folglich ist  $v_i$  abhängig von Versuchsbedingungen, u. a. von der Feldstärke. Um eine bessere Vergleichbarkeit der experimentellen Daten zu bekommen, ist es sinnvoll, die Migrationsgeschwindigkeit um eben diese Größe zu korrigieren. Hierdurch gelangt man zu dem Begriff der (absoluten) elektrophoretischen Mobilität  $\mu_i^0$  als dem Quotienten aus Migrationsgeschwindigkeit und Feldstärke:

$$\mu_i^0 = \frac{v_i^0}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad (\text{Gl. 10}).$$

$v_i^0$ : Migrationsgeschwindigkeit in idealen Lösungen [ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ]  
 $E$ : elektrische Feldstärke [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ]  
 $z_i$ : Ladungszahl der Spezies  $i$   
 $e_0$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A}\cdot\text{s}$ ]  
 $r_i$ : Innenradius der Kapillare [m]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]

Auch hier muß berücksichtigt werden, daß die Gleichung 10 prinzipiell nur für unendlich verdünnte Lösungen Gültigkeit besitzt. Unter isothermen Bedingungen ist die elektrophoretische Mobilität  $\mu$  eine geräteunabhängige Größe. Um die Gleichung auf reale Elektrolytlösungen anwenden zu können, müssen einige Modifikationen vorgenommen werden.

### 1.4.3 Effektive elektrophoretische Mobilität

Unter dem hydrodynamischen oder auch Stokes'schen Radius  $r_i$  versteht man den Radius eines sphärischen, kugelförmigen Körpers, welcher einen äquivalenten Strömungswiderstand besitzt wie das untersuchte Teilchen  $i$ . Dieser Parameter ist jedoch experimentell nur mit großem Aufwand zugänglich. Einerseits weichen die meisten Analyten bezüglich ihrer Geometrie von derjenigen einer Kugel ab. Andererseits stimmt der Durchmesser des solvatisierten Moleküls nicht mit den röntgenkristallo-

graphischen Werten überein. Berücksichtigt man zusätzlich die Tatsache, daß Ionen in wäßriger Lösung nicht nur von einer Solvathülle umgeben sind, wie in ideal, unendlich verdünnten Lösungen, sondern durch Coulomb-Kräfte zusätzlich auch Gegenionen anziehen, so ist es sinnvoll, den Begriff „Ionic atmosphere“ einzuführen. Dieser von Debye, Hückel und Onsager geprägte Begriff beschreibt den wirklichen Zustand des Analyten in realen Lösungen. Als Konsequenz dieser „Ionic atmosphere“ ergibt sich für den vorliegenden Teilchenradius  $R > r_i$  und für die effektive Ladung  $Q_{\text{eff}} < z_i \cdot e_0$ . Berücksichtigt man an dieser Stelle die oben genannten Anpassungen, so erhält man anstelle der (absoluten) elektrophoretischen Mobilität  $\mu_i^0$  als neue Größe die effektive elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  (Gl. 11):

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{v_i}{E} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6 \cdot \pi \cdot r_{\text{eff}} \cdot \eta} \quad (\text{Gl. 11}).$$

$v_i$ : beobachtete Migrationsgeschwindigkeit [ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $E$ : elektrische Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $Q_{\text{eff}}$ : effektive Ladungszahl der Spezies  $i$  [ $\text{A} \cdot \text{s}$ ]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $r_{\text{eff}}$ : Innenradius der Kapillare [ $\text{m}$ ]

### 1.4.4 $\zeta$ -Potential

In der Praxis beobachtet man bei unbeschichteten (bare fused silica) Kapillaren oberhalb eines pH-Wertes von etwa 2-3 das Phänomen, daß auch anionische Analyten bei normaler Polung (Anode einlaßseitig, Detektor, Kathode auslaßseitig) detektiert werden. Dies führt dazu, daß man in der CE eine weitere Größe eingeführt hat. Es handelt sich um die scheinbare elektrophoretische Mobilität ( $\mu_{\text{app}}$ , Gl. 12):

$$\mu_{\text{app}}(i) = \mu_{\text{eff}}(i) + \mu_{\text{EOF}} = \frac{v(i)}{E} \quad (\text{Gl. 12}).$$

Die Differenz aus scheinbarer ( $\mu_{\text{app}}$ ) und effektiver ( $\mu_{\text{eff}}$ ) elektrophoretischer Mobilität wird als elektroosmotische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  bezeichnet. Der Ursprung dieser Komponente ist der sogenannte elektroosmotische Fluß. Dieser wird auch Elektroendosmose genannt und läßt sich mit einer Pumpe vergleichen, die durch das elektrische Feld aktiviert wird. Um dieses Phänomen erklären zu können, ist es notwendig, die innere Oberfläche der Kapillare genauer zu betrachten. Die Kapillaroberfläche besteht aus amorphem, polymerem Siliciumdioxid.



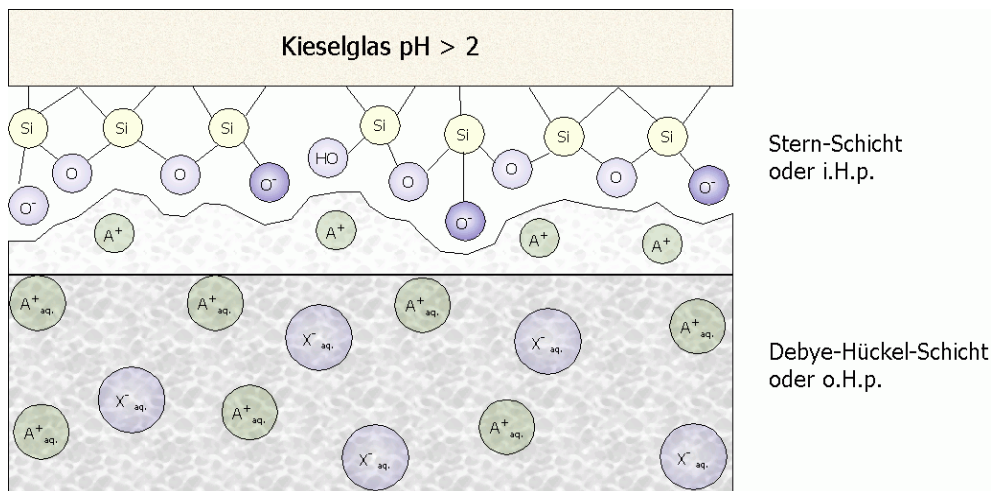


Abbildung 1.7: Helmholtz-Modell der Elektrochemischen Doppelschicht

Dieses Material läßt sich als Polysäure mit  $pK_S$ -Werten von 2-6 auffassen. Bei eingehender Untersuchung lassen sich auf der Oberfläche der Kapillaren verschiedene Bindungstypen für das Silicium nachweisen (Abb. 1.7). Neben Si-O-Si-Gruppen, sogenannten Siloxanen, die das Grundgerüst des Glases bilden, findet man auch Silanole, Si-OH-Gruppen, die durch die Hydrolyse von Siloxanen entstehen. Diese Silanole reagieren relativ sauer mit einem durchschnittlichen  $pK_S$ -Wert von  $\sim 6,3$  [16][17] und können in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Elektrolytlösung deprotoniert werden. Es liegt dann eine negativ geladene Glasoberfläche vor, an deren Grenze sich zur umgebenden Lösung das Potential  $\Psi_2$  ausbildet. Die Potentialdifferenz  $\Delta\Psi$  zwischen Glasoberfläche und wäßriger Lösung nimmt mit zunehmendem Abstand zur Phasengrenze ab. Ab einer bestimmten Entfernung sinkt das Potential auf  $\Delta\Psi = \Psi_2 - \Psi_1 = 0$  mV ab. Die von Stern aufgestellte Theorie besagt, daß sich an der negativ geladenen Oberfläche eine Schicht von fest adsorbierten Kationen ausbildet, die bei der Anlagerung ihre Solvathüllen verlieren und als vollständig unbeweglich angesehen werden. Die Dicke dieser monomolekularen Schicht liegt in der Ordnung von etwa 100 pm bis zu wenigen nm. Innerhalb dieser Schicht fällt das Potential linear zum Abstand von der Glasoberfläche um einen bestimmten Betrag auf das Potential  $\phi$  an der Schichtgrenze ab. Diese starre Ebene nennt man auch Stern-Schicht oder innere Helmholtz-Schicht (engl.: inner Helmholtz plane i.H.p.) und bezeichnet die innere Phase der elektrochemischen Doppelschicht. Sie grenzt an die äußere Helmholtz-Schicht (engl.: outer Helmholtz plane; o.H.p.), welche auch als Gouy-Chapman- oder Debye-Hückel-Schicht bezeichnet wird. Sie ist dadurch charakterisiert, daß innerhalb dieser Phase

ebenfalls ein Überschuß an positiven Ladungsträgern vorliegt. Diese sind im Unterschied zu den Ionen der i.H.p. noch hydratisiert und können sich in der Lösung bewegen. Auf die Kationen wirken elektrostatische Anziehungskräfte, welche sie zur Glasoberfläche ziehen, gleichzeitig diffundieren sie aufgrund des Konzentrationsgradienten radial von der Grenzfläche in Richtung der elektrisch neutralen Lösung.

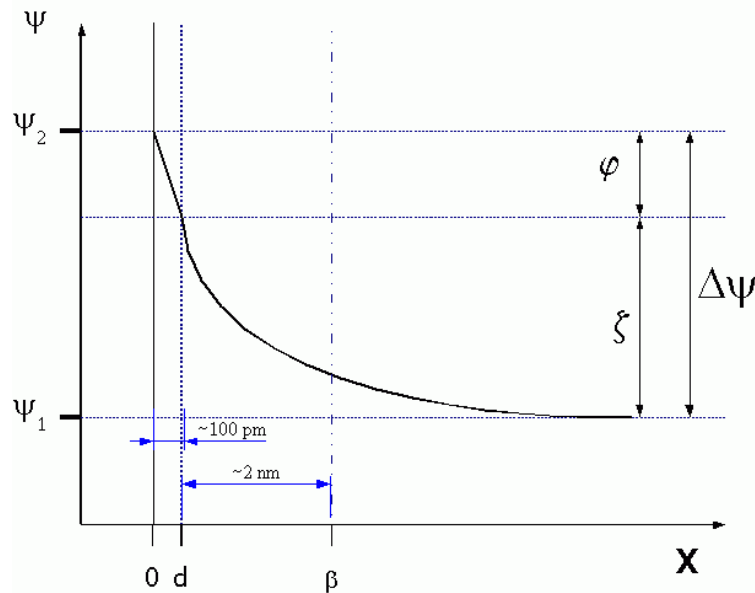


Abbildung 1.8: Potentialdifferenzen an der Kapillaroberfläche

Die Dicke dieser Schicht hängt deshalb von dem dynamischen Gleichgewicht beider Prozesse ab. Die Phasengrenze der Gouy-Chapman-Schicht ist nicht scharf umrissen und geht in die elektrisch neutral erscheinende wäßrige Phase in der Kapillare über. In Abhängigkeit von der Schichtdicke erhält man ein Potential, welches auch als  $\zeta$ -Potential bezeichnet wird. In Abbildung 1.8 sind die Potentialdifferenzen gegen den Abstand zur Oberfläche aufgetragen, wobei anhand des Diagramms der Zusammenhang zwischen der Potentialdifferenz  $\Delta\psi$ ,  $\phi$  und  $\zeta$  deutlich wird.

Der innerhalb der o.H.p. beobachtete exponentiellen Abfall des Potentials ist von der Temperatur, dem Debye-Hückel-Parameter sowie der Potentialdifferenz selbst abhängig, welche in die Poisson-Boltzmann-Gleichung (Gl. 13) eingehen [18]:

$$\frac{d\psi}{dx} = -\frac{2 \cdot \kappa \cdot k_B \cdot T}{z \cdot e^0} \cdot \sinh \frac{-z \cdot e^0 \psi}{2 \cdot k_B \cdot T} \quad (\text{Gl. 13}).$$

$$\sinh(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{2}$$

$d\psi$ : Potentialdifferenz  
 $dx$ : Abstand zur o.H.p.  
 $\kappa$ : Debye-Hückel-Parameter [ $\text{m}^{-1}$ ]  
 $k_B$ : Boltzmann-Konstante  
 $T$ : Temperatur [K]  
 $z_i$ : Ladungszahl  
 $e^0$ : Elementarladung

Die Gleichung nimmt eine Boltzmann-verteilte Konzentration der Ionen in der Grenzschicht an. Da sich die ablaufenden Vorgänge der Radialdiffusion von Kationen mit einem Laplace-Operator beschreiben lassen, kann das zugrunde liegende Vektorfeld mit der Poisson-Gleichung abgeleitet werden. Die exakte Schichtdicke der äußeren Helmholtz-Schicht läßt sich nur mit erheblichem Aufwand bestimmen [18]. Zur Vereinfachung nimmt man für das  $\zeta$ -Potential die Abschirmlänge (Debye-Länge) als Approximation an [16] (Gl. 14):

$$\begin{aligned}
 \beta &= \sqrt{\frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot k_B \cdot T}{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I_i}} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot R \cdot T}{2 \cdot F^2 \cdot I_i}} = \sqrt{\frac{\epsilon \cdot R \cdot T}{8\pi \cdot F^2 \cdot I_i}} \\
 &= \sqrt{\frac{R}{8\pi \cdot F^2}} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon \cdot T}{I_i}} = K^0 \cdot \sqrt{\frac{\epsilon \cdot T}{I_i}} = \frac{1}{\kappa}
 \end{aligned}
 \quad (\text{Gl. 14}).$$

$\beta$  = Dicke Gouy-Chapman-Schicht [m]  
 $\kappa$  = Debye-Hückel-Parameter [ $\text{m}^{-1}$ ]  
 $\epsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante des Vakuums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $\epsilon_{\text{rel}}$  = relative Dielektrizitätskonstante [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante des Mediums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $k_B$  = Boltzmann Konstante =  $N_A \cdot F$  [ $1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ]  
 $F$  = Faraday-Konstante [ $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ]  
 $I$  = Ionenstärke [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]  
 $N_A$  = Avogadro'sche Zahl [ $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ]  
 $R$  = allg. Gaskonstante [ $8,31447 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]  
 $T$  = Temperatur [K]

Nimmt man eine Raumtemperatur von 25°C an, so läßt sich Gl. 14 für ausreichend verdünnte Lösungen mit  $\epsilon_{\text{rel}} = 78,3$  vereinfachen (Gl. 15):

$$\beta = \frac{1}{\kappa} = K^0 \cdot \sqrt{\frac{\epsilon \cdot T}{I_i}} = \frac{3 \cdot 10^{-8}}{\sqrt{I_i}} \quad [\text{cm}]
 \quad (\text{Gl. 15}).$$

Anhand dieser Formel läßt sich auch der Einfluß der Ionenstärke (Gl. 16 nach Lewis und Randall) auf die Reichweite des Oberflächenpotentials zeigen.

Mit Erhöhung der Ionenstärke nimmt die Konzentration aller Ionen zu, auch die der Anionen, was zu einer effizienteren Abschirmung der geladenen Oberfläche führt.

$$I_i = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_i \quad (\text{Gl. 16})$$

- $I_i$ : Ionenstärke [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]  
 $z_i$ : Ladungszahl des Teilchens  $i$   
 $c_i$ : Konzentration von  $i$  [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]

Eine weitere wichtige Größe, die in der Poisson-Boltzmann-Gleichung nur indirekt Berücksichtigung findet, ist die Ladungsdichte  $\sigma$  auf der Kapillaroberfläche, respektive die Anzahl der deprotoniert vorliegenden Silanol-Gruppen. Die Ladungsdichte  $\sigma$  spiegelt die pH-Abhängigkeit des  $\zeta$ -Potentials im Bereich von  $\sim 2$ -8 wider. Diese wird in der von Kohr und Engelhardt [19] modifizierten Form berücksichtigt (Gl. 17).

$$\sigma = \sqrt{8 \cdot k \cdot T \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \eta} \sinh\left(\frac{z \cdot e_0 \cdot \zeta}{2 \cdot k \cdot T}\right) = \sqrt{8 \cdot k \cdot T \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \eta} \frac{e^{\frac{z \cdot e_0 \cdot \zeta}{2 \cdot k \cdot T}} - e^{-\frac{z \cdot e_0 \cdot \zeta}{2 \cdot k \cdot T}}}{2} \quad (\text{Gl. 17})$$

- $\sigma$ : Ladungsdichte der Kapillaroberfläche [ $\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $T$ : Temperatur [K]  
 $k$ : Boltzmann-Konstante [ $1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ]  
 $\epsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante des Vakuums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $\epsilon_r$ : relative Dielektrizitätskonstante [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $\eta$ : kinematische Viskosität [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]  
 $z_i$ : Ladungszahl der Spezies  $i$   
 $e_0$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$ ]  
 $\zeta$ : Zetapotential o.H.p. [mV]

Für Systeme, bei denen die Partikelgröße (in diesem Fall die Dicke des Kapillarkörpers) deutlich über derjenigen der elektrochemischen Doppelschicht liegt, lässt sich die nach von Smoluchowski benannte Gleichung (Gl. 18) anwenden. Sie stellt eine Verknüpfung zwischen elektroosmotischer Mobilität, Ladungsdichte auf der Oberfläche und Debye-Länge her [20]:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{4 \pi \cdot \eta} \approx \frac{\sigma}{4 \pi \cdot \eta \cdot \kappa} = \frac{\sigma \cdot \beta}{4 \pi \cdot \eta} \quad (\text{Gl. 18}).$$

- $\mu_{\text{EOF}}$ : elektroosmotische Mobilität [ $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]  
 $\zeta$ : Zetapotential o.H.p. [mV]  
 $\epsilon$ : Dielektrizitätskonstante des Mediums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $\eta$ : kinematische Viskosität [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]  
 $\sigma$ : Ladungsdichte der Kapillaroberfläche [ $\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]  
 $\kappa$ : Debye-Hückel-Parameter [ $\text{m}^{-1}$ ]  
 $\beta$ : Debye-Länge [m]

Für Partikel, deren Größe in Relation zur elektrochemischen Doppelschicht relativ klein ist, hat es sich aufgrund empirischer Befunde als hilfreich erwiesen,  $4\pi\eta$  durch

$6\pi\eta$  zu substituieren. Die Bedeutung des  $\zeta$ -Potentials in der Elektrophorese erwächst aus dem Einfluß auf die elektrophoretische Mobilität. Je weiter die o.H.p. in die Kapillare hinein reicht, desto ausgeprägter ist der elektroosmotische Fluß.

### 1.4.5 Elektroosmotischer Fluß (EOF)

#### 1.4.5.1 Strömungsprofile

Die Geometrie der Probenzonen weist in der Kapillarelektrophorese einige Besonderheiten auf. Während in der HPLC parabolisch geformte Probenzonen den Normalfall darstellen, treten diese in der CE - außer bei Spülschritten und der hydrodynamischen Injektion - nur auf, wenn zur Unterstützung eines geringen elektroosmotischen Flusses zusätzlicher Druck eingesetzt wird (Abb. 1.9, A). Dies ist beispielsweise der Fall, wenn der Beitrag der elektroosmotischen Mobilität zur Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten zu gering ist und die Analysenzeiten innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens gehalten werden sollen.

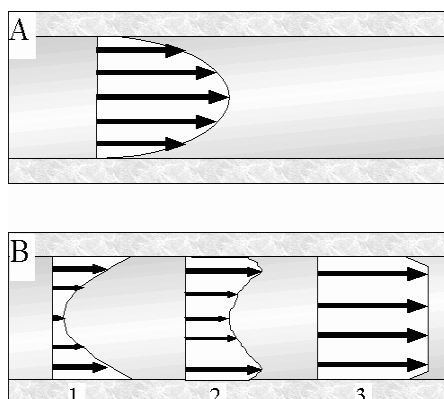


Abbildung 1.9: Strömungsprofile  
A) hydrodynamische, B) elektroosmotisch

Das von Gouy, Chapman, Stern und Graham entwickelte Modell der elektrochemischen Doppelschicht besagt, daß sich in der Debye-Hückel-Schicht ein Überschuß beweglicher, solvatisierter Ladungsträger befindet. Wird ein elektrisches Feld längs zu der Grenzschicht aufgebaut, beginnen die Kationen in Richtung des Kapillarauslasses und damit in Richtung des Detektionsfensters zu migrieren. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß die Ladungsträger von einer Solvathülle umgeben sind. Die Wassermoleküle interagieren ihrerseits untereinander durch Wasserstoff-Brückenbindungen, so daß die gesamte Flüssigkeitssäule in Bewegung versetzt wird. Da die beschleunigende Kraft von den Kationen in der diffusen Doppelschicht vermittelt wird, resultiert zunächst ein invers parabolisches Strömungsprofil in der Kapillare

(Abb. 1.9, B 1), das jedoch schnell in ein stempelförmiges übergeht (Abb. 1.9, B 2 u. 3). Die CZE unterscheidet sich dadurch von der HPLC und anderen, hydrodynamisch basierten Methoden. Bei diesen treten Strömungsturbulenzen an der Phasengrenze zwischen Glasoberfläche und Lösung auf und es resultiert ein Gradient der Wandergeschwindigkeiten. Das stempelförmige Profil ist einer der Gründe für die hohe Trennleistung der CE: die radial einfallenden Lichtstrahlen treffen auf eine schärfer begrenzte Analysenzone als beispielsweise in der HPLC. Die typische Gauß-Form der Substanzpeaks entsteht dadurch, daß innerhalb der Probenzone Axialdiffusionsprozesse auftreten. Hinzu kommen Konvektionseinflüsse, die trotz effizientester Mechanismen zur Wärmeableitung nicht ganz eliminiert werden können.

### 1.4.5.2 EOF-Marker

Aus den Gleichungen 9-14 ergibt sich einerseits die Komplexität des elektroosmotischen Flusses, andererseits die Vielfalt der Einflußgrößen. Um die elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten ermitteln zu können, müßte ein enormer Aufwand betrieben werden, um alle numerischen Werte der Faktoren, welche zu berücksichtigen sind, zu ermitteln. In der Praxis wählt man eine andere Vorgehensweise, indem man elektrisch neutrale Substanzen als EOF-Marker verwendet, da diese ausschließlich durch den elektroosmotischen Fluß transportiert werden. Neben einer ausreichenden Löslichkeit in der Elektrolytlösung müssen sie über einen ausreichend großen pH-Bereich elektrisch neutral reagieren, dürfen nicht mit der Kapillaroberfläche interagieren und liefern in Abhängigkeit von dem gewählten Detektionsverfahren ein Meßsignal, welches sich hinreichend von dem des Puffersystems unterscheidet. Unter Berücksichtigung der Gleichungen 6, 19 und 20 ergibt sich für elektrisch neutrale Teilchen die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  (Gl. 21):

$$v(i) = \frac{l_{\text{det}}}{t(i)} \quad (\text{Gl. 19})$$

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E \quad (\text{Gl. 20})$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{l_{\text{det}}}{t_{\text{det}}} \cdot \frac{l_{\text{ges}}}{U} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (\text{Gl. 21}).$$

$l_{\text{det}}$ : effektive Kapillarlänge [cm]  
 $l_{\text{ges}}$ : gesamte Kapillarlänge [cm]  
 $t_{\text{det}}$ : Migrationszeit eines ungeladenen Teilchens [s]  
 $U$ : Spannung [V]

Berücksichtigt man weiterhin, daß sich die scheinbare elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{app}}$  nach Gl. 8 aus der Summe von  $\mu_{\text{eff}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  ergibt, so gelangt man durch Umformung der Gleichung und Einsetzen von Gleichung 21 zu einer Möglichkeit, aus den Migrationszeiten des Analyten, des EOF-Markers, den Abmessungen der Kapillare und der angelegten Spannung die effektive Mobilität des Analyten zu berechnen (Gl. 22):

$$\mu_{\text{app}}(i) = \mu_{\text{eff}}(i) + \mu_{\text{EOF}} \Leftrightarrow \mu_{\text{eff}}(i) = \mu_{\text{app}}(i) - \mu_{\text{EOF}}$$

$$\mu_{\text{eff}}(i) = \frac{v(i)}{E} - \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{l_{\text{ges}}}{U} \cdot \left( \frac{l_{\text{det}}}{t(i)} - \frac{l_{\text{det}}}{t_{\text{EOF}}} \right) = \frac{l_{\text{ges}} \cdot l_{\text{det}}}{U} \cdot \left( \frac{1}{t(i)} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (\text{Gl. 22}).$$

## 1.5 Kapillaren

### 1.5.1 Kapillartypen

In der Kapillarelektrophorese finden verschiedene Typen von Kapillaren Anwendung. Der am weitesten verbreitete Typ ist die unbeschichtete oder auch als bare fused silica bezeichnete Kapillare, bei der die Oberfläche keinerlei weiteren Modifikationen unterworfen wird. Im Bereich der Kapillarisoelektrischen Fokussierung und der DNA-Sequenzierung werden hingegen fast ausschließlich beschichtete Kapillaren verwendet. Bei der Beschichtung differenziert man zwischen permanenten, kovalent mit dem Kieselglas verknüpften Beschichtungen und solchen, bei denen meist hochmolekulare Substanzen (vgl. Kapitel 3.3.2) als Zusätze in der Elektrolytlösung verwendet werden, die jedoch nicht kovalent gebunden sind [21]. Auf den Themenkomplex wird im Zusammenhang mit den Kapillaruntersuchungen in Kapitel 3 detailliert eingegangen.

### 1.5.2 Konditionierung

Im Gegensatz zu permanent beschichteten Kapillaren müssen die unbeschichteten Kieselglaskapillaren vor der Benutzung einer Vorbehandlung unterworfen werden. Die in Kapitel 1.4 beschriebenen theoretischen Grundlagen spiegeln sich in der Praxis wieder bezüglich der Vorbereitung von Kieselglaskapillaren. Wie aus der Entstehung des  $\zeta$ -Potentials deutlich wird, muß die Oberfläche zunächst aktiviert werden, indem die Siloxan-Funktionen unter dem Einfluß von wäßrigen Alkalilaugen hydrolysiert werden. Durch diesen als Konditionierung bezeichneten Schritt erhält man eine gleichmäßige Oberflächenladungsdichte, die eine Voraussetzung für einen stabilen elektroosmotischen Fluß ist, respektive für eine reproduzierbare elektroosmotische Mobi-

lität. Nur unter dieser Voraussetzung ist die elektrophoretische Mobilität der Analyten über die gesamte Trennstrecke hinweg als konstant anzusehen und man beobachtet eine uniforme Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten. Im Kapitel 1.1.3 – UV-Detektion wurde auf die große Bedeutung gleichbleibender Migrationszeiten für die Reproduzierbarkeit der Peakflächen eingegangen.

### **1.5.3 Äquilibration**

In dem anschließenden, auch als Äquilibration bezeichneten Prozeß, wird die Kapillare auf den pH-Wert eingestellt, bei dem die Durchführung der jeweiligen Methode erfolgt. Zum einen muß sich das lokal begrenzte Puffersystem aus Silanol-Gruppen dem pH-Wert des verwendeten Puffersystems angleichen, wobei die Hysteresis dieses Prozesses in Abhängigkeit des pH-Wertes einige Stunden umfassen kann [16]. Zum anderen muß sich in der elektrochemischen Doppelschicht das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Kationen einstellen, die in der Elektrolytlösung vorkommen [22]. Dieser Prozeß trägt wie die Konditionierung zu einer Stabilisierung des elektroosmotischen Flusses bei, und ist Voraussetzung für die erfolgreiche und reproduzierbare Durchführung einer elektrophoretischen Trennung.



## 2 Aufgabenstellung

“CZE of proteins may, in fact, be the most complicated form of CE.”

Dieses Zitat aus einem Lehrbuch der Kapillarelektrophorese [1] bringt die Schwierigkeiten zum Ausdruck, welche bei der Analytik von Proteinen auftreten können [5]. In Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen können diese Makromoleküle unterschiedliche Wechselwirkungen mit Oberflächen eingehen. Dieses Grundproblem betrifft u.a. die Qualitätssicherung neuer, innovativer Arzneistoffe [23][24] wie Interferone, monoklonale Antikörper oder Peptid-/Proteohormone. Daher stellen sich neuartige Anforderungen an die Analysenverfahren. Während im Bereich der Pharmaindustrie das Hauptaugenmerk auf Robustheit, Präzision und Reproduzierbarkeit gerichtet ist, stehen im Bereich der Proteomanalytik andere Aspekte im Vordergrund: Automatisierbarkeit, Empfindlichkeit und Auflösung. Der Grund sind die komplexen Matrices, aus denen die Analyten bestimmt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf verschiedene Parameter gerichtet, welche die Leistungsfähigkeit der CE maßgeblich beeinflussen:

- (a) Chemie der Kapillaroberflächen
- (b) Protein-spezifische Faktoren der Adsorption
- (c) Modifikation der Oberfläche durch (kovalente) Beschichtungen.

Der Schwerpunkt liegt auf der systematischen Untersuchung von Faktoren, welche die Tendenz des Makromoleküls beeinflussen, an Grenzflächen zu adsorbieren. Zu den wichtigsten Proteineigenschaften gehört der isoelektrische Punkt (IP), zu dem es aber keine quantitativen Untersuchungen gibt. Außerdem sind in der Literatur andere Parameter nicht oder nur unzureichend beschrieben worden. Neben der Konzentration des Analyten müssen als kritische Faktoren auch seine physikochemischen Eigenschaften wie Molekulargewicht, GRAVY-score als Maß für die Hydrophobie, und Tertiär-/Quartärstrukturen als potentielle Einflußgrößen erörtert werden. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht alle Proteinklassen untersucht werden können, richtet sich der Fokus auf globuläre, nicht membrangebundene Proteine, die jedoch ein breites Spektrum an Eigenschaften abdecken, sowie in gleichbleibender Qualität verfügbar sind. Eines der weiterführenden Ziele ist die Entwicklung und Etablierung eines Proteingemisches für die CZE. Dieses soll als ein Testsystem für die Methodenent-

wicklung im Bereich Proteomanalytik eingesetzt werden können, wie sie in ähnlicher Form bereits in der 2D-Gelelektrophorese verwendet werden [25].

Ein weiterer Aspekt, der in der Literatur beschrieben wird, ist die Bildung von Proteinadsorbaten und deren negativer Einfluß auf die Leistungsfähigkeit der Kapillarelektrophorese [26][27]. Im schlimmsten Fall wird die Kapillare durch diese Plaques unbrauchbar. Damit ist die Frage verbunden, welche Maßnahmen ergriffen werden können, um die Interaktionen der Proteine an Grenzflächen – mit vertretbarem Aufwand - kontrollierbar zu machen, wenn nicht sogar diese auf ein Minimum zu reduzieren. In dem Zusammenhang sind auch die Versuche zu sehen, die mit beschichteten Kapillaren durchgeführt werden sollten. Eine der zentralen Fragen ist , unter welchen Bedingungen die Beschichtungen bessere Resultate gegenüber konventionellen Kieselglaskapillaren liefern. In den Fällen, in denen die Beschichtungen die Adsorption nicht mehr verhindern kann, sollten sich aus diesen Versuchsbedingungen dann Rückschlüsse auf die Art von Wechselwirkungen zwischen Protein und relativ hydrophober Fläche ziehen lassen. Zu den Anforderungen, die an kovalente Beschichtungen gestellt werden, gehören u.a. die Stabilität, Reproduzierbarkeit und Homogenität der Beschichtung, da sie die Leistungsfähigkeit der CE entscheidend beeinflussen.

In der Literatur finden sich nur wenig statistisch auswertbare Informationen zur Analytik von Proteinen mittels kapillarelektrophoretischer Methoden. Die Angaben beschränken sich meist auf die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Peakflächen, wobei es sich um Versuchsreihen mit relativ wenigen Läufen handelt. Insbesondere Informationen zur Wiederholpräzision fehlen gänzlich. Um das Verhalten von Proteinen in der CZE jedoch eingehender studieren zu können, muß die Zeitkomponente als ein maßgeblicher Faktor berücksichtigt werden.

Im Rahmen der Arbeit soll anhand umfangreicher Meßreihen geprüft werden, ob der Adsorptionsvorgang selbst oder nachfolgende Prozesse maßgeblich sind für die eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Um Überlagerungen mit systembedingten, langfristig trendbehafteten Effekten ausschließen zu können, muß zunächst ein passendes Versuchsprotokoll entwickelt werden. Die Untersuchung der dabei anfallenden Datenmengen soll zeigen, ob es möglich ist, durch Anwendung statistischer Methoden auf die gewonnenen Datensätze, kritische Versuchsbedingungen zu erkennen, z.B. die Prüfung auf t- und f-verteilte Meßgrößen und die Bildung von Vertrauensintervallen.

## 3 Oberflächenchemie der Kapillaren

### 3.1 Herstellung

Die Entwicklung verschiedenster Analysentechniken wie GC, KapillarLC, CEC, nano-LC und CE sind erst durch den Durchbruch auf dem Gebiet des Fertigungsprozesses von hochreinem Quarzglas möglich geworden. Zu den entscheidenden Faktoren gehört unter anderem der Einsatz von amorphem Siliciumdioxid anstelle von Borosilikaten, da dieser Werkstoff Eigenschaften aufweist, welche für die Anwendung im Bereich der Glasfaserlichtleiter ausschlaggebend waren. Die wichtigsten Merkmalen sind:

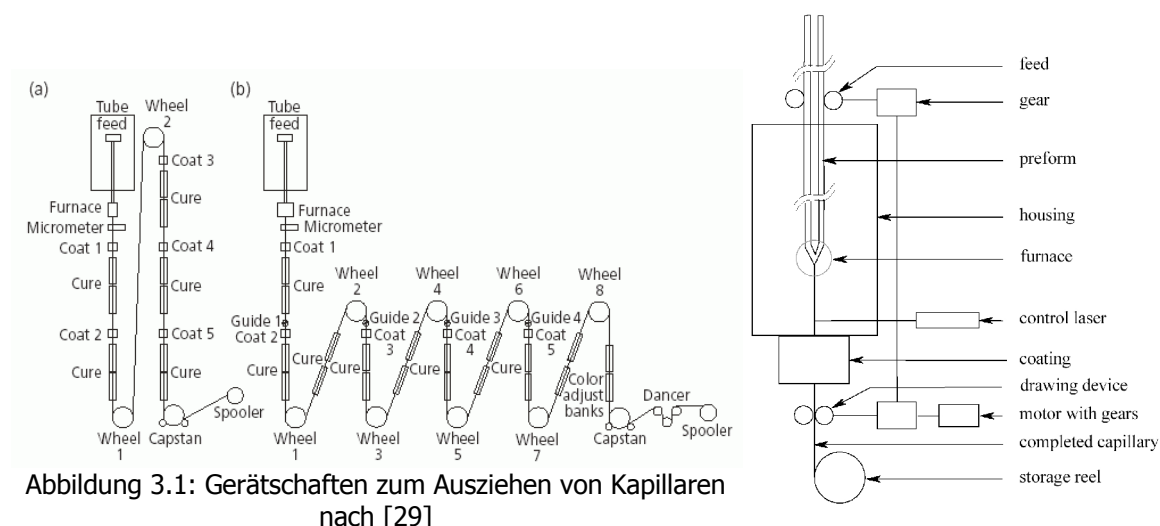
- sehr hohe UV-Durchlässigkeit
- eine extrem niedrige thermische Ausdehnung
- hohe Temperaturbeständigkeit bis etwa 1400°C
- sehr geringe dielektrische Verluste
- sehr geringe elektrische Leitfähigkeit (auch bei hohen Temperaturen)
- hohe chemische Resistenz gegen Säuren und Wasser.

Bei den üblichen Verfahren<sup>1</sup> zur Herstellung des Rohmaterials handelt es sich ausschließlich um Gasphasen-Verfahren, bei denen man das Ausgangsprodukt  $\text{SiCl}_4$  durch vorhergehende Destillation in hohem Maße aufgereinigt und dann bei Temperaturen von über 1800°C im Sauerstoffstrom verbrennt [10]. Die Reinheit des so gewonnenen Glases liegt weit über der Qualität, die man mit naß-chemischen Verfahren erreichen kann, was sich positiv auf die Leistungsfähigkeit der daraus gefertigten Kapillaren auswirkt, auch beispielsweise in der Gaschromatographie [28].

Aus dem Rohmaterial werden zunächst Rohlinge hergestellt, die dann aufgebohrt werden. Die Hohlzylinder werden in mehreren Schritten zu immer dünneren Rohlingen ausgezogen und im letzten Herstellungsschritt auf die endgültigen Dimensionen gebracht. Die typischen Gerätschaften, die beim Ausziehen verwendet werden, sind in Abb. 3.1 gezeigt. Man unterscheidet zwischen Verfahren mit langsamem Zug, bei denen die fertige Kapillare über wenige Rollensysteme läuft (a) und solchen, die mit schneller rotierenden Capstan-Antrieben und Zug über mehrere Rollen arbeiten (b).

---

1 PCVD: plasma activated chemical vapor deposition  
MCVD: modified chemical vapor deposition  
OVD: outside vapor deposition  
VAD: vapor axial deposition



Die Rohform wird über einen Vortrieb (gear, tube feed) zum Ofen geführt, wo das Material auf über 2000°C erhitzt wird. Der Formgebungsprozeß wird von einem Capstan-Antrieb gesteuert, der die Zugspannung über Rollensysteme (wheels) auf den Rohling überträgt. Nach dem Verlassen des Heizsystems (furnace) wird eine Inline-Kontrolle (micrometer) mittels Lasermeßinstrumenten (laser control) vorgenommen, bevor die erste von mehreren Polyimidschichten (coat) auf die Kapillare aufgebracht und dann gehärtet (cure) wird.

Dem Abkühlprozeß kommt große Bedeutung zu. Während das Ziehen der Kapillare bei Temperaturen über 2000°C erfolgt, muß anschließend beim Auskühlen ein eng vorgegebener Temperaturgradient eingehalten werden, damit keine Spannungen im Material auftreten. Gerade die Zonen, in denen die thermischen Spannungen konserviert werden, neigen dazu, Kristallisationskeime zu bilden, aus denen sich dann Haarrisse, etc. bilden können. Aus dieser kurzen Beschreibung des Herstellungsprozesses [29] wird ersichtlich, daß auf der inneren Oberfläche der Kapillaren während des gesamten Prozesses extreme Bedingungen herrschen. Deren Chemie ist kaum untersucht bzw. die entsprechenden Forschungsergebnisse sind für die Herstellung von Kapillaren nicht veröffentlicht. Daher ist man bei der Suche nach Quellen zur Oberflächenanalytik von Gläsern auf andere Forschungsbereiche angewiesen.

In der Herstellung von optischen Systemen, die der Belastung durch hochenergetische Laser ausgesetzt sind, spielt die Oberflächenbeschaffenheit eine große Rolle. Aus diesem Grund gibt es auch eingehende Untersuchungsergebnisse. Die Anwendungsbreite und Lebenszeit von optischen Systemen hängt von den Eigenschaften, u.a. der Widerstandsfähigkeit der Glaskomponenten ab, und es ist daher wenig ver-

wunderlich, daß diese eingehend charakterisiert werden [30]. Neben den Spezifikationen, die den Herstellungsprozeß betreffen (ISO 10110 "Optics and optical instruments – Preparation of drawing for optical elements and systems"), existieren auch anwendungsspezifische Vorgaben zur Testung der Absorptions- und Streuungseigenschaften sowie der Widerstandsfähigkeit gegenüber Laser-induzierten Defekten (LIDT: Laser induced damage threshold). Während die verarbeitungsbedingten Vorgaben (Entspannung des Glases, Blasen und Einschlüsse, Inhomogenitäten und Schlieren) ausreichend festgeschrieben sind, sind die Prüfungen der anwendungsorientierten Eigenschaften wie Oberflächenfehler, Fokussierungsfehler, LIDT und insbesondere Verunreinigungen der Oberfläche nur unzureichend festgelegt. Gerade diese Verunreinigungen, welche beim Nachbearbeiten und Polieren der Oberfläche auftreten, werden nur unzureichend spezifiziert. Die Oberflächenstruktur optischer Glas-komponenten läßt sich nur durch einzelne Parameter beschreiben wie der Dichte von Mikrodefekten oder der sogenannten Oberflächenrauheit. In verschiedenen Quellen [31][32][33][34] wird auf die möglichen Prozesse eingegangen, die zur Oberflächenveränderung nach Einwirkung von Laserlicht jedweder Art führen können.

Im Gegensatz dazu gibt es für die Herstellung und Prüfung von Kieselglaskapillaren keine übergreifenden, normierten Vorschriften, so daß ein Qualitätssicherungssystem von dem jeweiligen Hersteller aufgebaut werden muß. Folglich hat jedes einzelne Unternehmen Methoden entwickelt, um die innere Kapillaroberfläche durch eine Schutzgasatmosphäre vor unkontrollierbaren, chemischen Veränderungen zu schützen. Trotzdem traten in der Vergangenheit bei einzelnen Kapillarchargen immer wieder Anomalien auf, die sich z.B. durch einen nicht reproduzierbaren EOF äußerten.

Bei den Bemühungen, die Ursache für dieses merkwürdige Verhalten zu ermitteln, werden verschiedene Analysetechniken angewendet, mit denen die innere Oberfläche eingehender untersucht wird. Neben bildgebenden Verfahren, wie der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und der Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy; AFM), lassen sich auch Oberflächen-spektroskopische Methoden bei dieser Problemstellung einsetzen [35]. Neben der Auger- oder Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) liefert gerade die Röntgenstrahlphotoelektronenspektroskopie (x-ray induced photoelectron spectroscopy; XPS) Informationen zu den Elementen, welche auf der Oberfläche vorkommen, insbesondere zu den Bindungsverhältnissen.

## 3.2 Untersuchung der Kapillaroberflächen

### 3.2.1 Röntgenstrahlphotoelektronenspektroskopie – XPS

#### 3.2.1.1 Theorie der XPS

Das Grundprinzip der XPS basiert auf dem Beschuß mit Röntgenstrahlung diskreter Wellenlänge auf eine im Vakuum befindliche Probe. Die gesamte Energie des Röntgenquants wird für die Anregung eines einzelnen, kernnahen Elektrons benötigt. Durch die Kopplung mit dem Photon wird es auf ein hohes Energieniveau oberhalb des Valenzbandes angehoben. Es wird so förmlich aus dem Atom herausgeschlagen (Abb. 3.2). Ein Teil der Energie,  $E_s$ , wird für die Anregung des Elektrons innerhalb des Valenzbandes benötigt. Die Komponente  $\Phi_s$  wird als Arbeitsfunktion bezeichnet und ist abhängig vom Meßgerät und der Probe selbst, wobei die elektrische Leitfähigkeit bzw. die Tendenz zur elektrischen Aufladung der Probe mit eingeht. Die restliche Energie wird in kinetische Energie umgewandelt, mit der das Elektron emittiert wird. Somit ergibt sich für die Energiebilanz (Gl. 23):

$$E_{\text{kin}} = h \cdot \nu - E_s - \Phi_s \quad (\text{Gl. 23}).$$

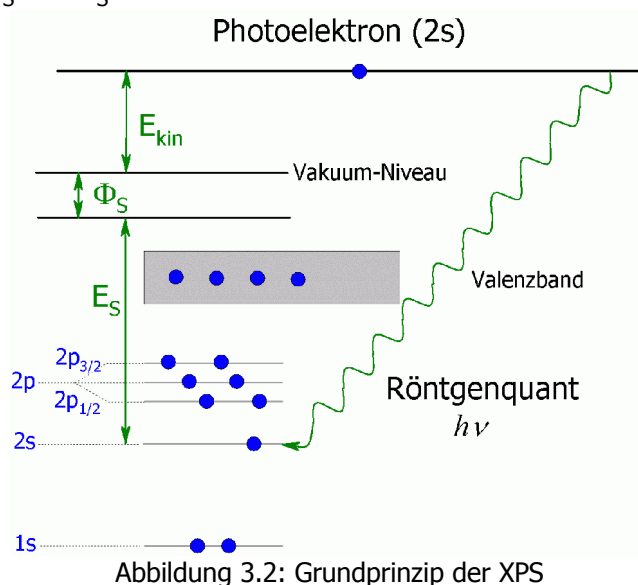


Abbildung 3.2: Grundprinzip der XPS

Ein Merkmal der Photoelektronenspektroskopie ist, daß die Intensität dieser abgestrahlten Quanten, jedoch nicht ihre kinetische Energie, von der Intensität des eingestrahnten Lichtes abhängt. Mit anderen Worten bedeutet dies, daß eine längere Bestrahlung mit Röntgenlicht zu mehr emittierten Photoelektronen führt, diese aber alle die gleiche kinetische Energie aufweisen. Eben diese Energie ist charakteristisch für jedes Element und spezifisch für den Bindungszustand, aus dem das Elektron

stammt, insbesondere auch für die chemische Umgebung des untersuchten Elementes. In XPS-Spektren wird die Zahl der gemessenen Photoelektronen gegen die eingestrahlte Energie in eV aufgetragen [36]. Dabei ergibt sich für jeden Bindungszustand ein gaußförmiger Peak. Mit einer geringen zeitlichen Verzögerung kommt es zur Emission von Auger- oder Sekundärelektronen. Diese werden dadurch frei, daß ein Valenzelektron auf das Niveau des emittierten Photoelektrons abfällt und dabei Energie abgegeben wird: Sie reicht aus, um weitere Elektronen aus dem Atomrumpf freizusetzen. Diese lassen sich ebenfalls auswerten. Man bezeichnet dieses oberflächenanalytische Verfahren als Augerelektronenspektroskopie.

### **3.2.1.2 Möglichkeiten und Grenzen der XPS**

Mit Hilfe der XPS lassen sich alle Elemente außer Wasserstoff und Helium nachweisen, sofern der Molmengenanteil über 0,1 bis 1% (mol/mol) liegt. Nur die obersten Schichten einer Oberfläche lassen sich untersuchen, weil die geringe Eindringtiefe der Röntgenstrahlung die Tiefenauflösung auf 1 nm limitiert. Damit ist die Photoelektronenspektroskopie sehr gut geeignet, Festphasengrenzen auf ihre elementare Zusammensetzung hin zu untersuchen. Allerdings sind nur qualitative und halbquantitative Aussagen möglich, da die Ergebnisse mit einer relativen Standardabweichung von ca. 20% behaftet sind. Für jedes Element lassen sich verschiedene Bindungszustände charakterisieren, die sich aufgrund unterschiedlicher Hybridisierungszustände und unterschiedlicher Bindungspartner ergeben.

### **3.2.1.3 Experimentelle Daten**

Bei einer eingehenden Untersuchung von Kieselglaskapillaren (O.D. 363 µm, I.D. 51 µm) mittels XPS konnten Silicium-Kohlenstoffverbindungen identifiziert werden, sogenannte Silane, deren Herkunft relativ lange im Unklaren blieb. Die Kapillare wird zunächst mit 1 mol·l<sup>-1</sup> Natronlauge konditioniert, wobei entsprechende Proben nach 0, 30, 300 und 600 min genommen werden. Die Kapillarstücke werden mit Wasser gespült und in einer eigens entwickelten Form in Epoxydharz eingebettet. Nach dem Aushärten des Trägermaterials werden die Kapillaren in axialer Richtung aufgeschliffen [37], wobei das Material in 10 µm Schritten abgetragen wird, bis das Kapillarlumen frei präpariert ist.

Die Untersuchungen wurden mit einem Röntgenphotoelektronen-Spektrometer vom Modell AXIS-HS (Kratos, Manchester, UK) durchgeführt unter Verwendung von nicht monochromatischer Al K $\alpha$  Strahlung zur Anregung der Elektronen. Die Messungen erfolgten, bedingt durch die Oberflächengeometrie der Kapillaren, in einem 0° take-off Winkel. Der als Detektor verwendete konzentrisch-hemisphärische Analysator (CHA) wird so eingestellt, daß nur Elektronen ab einer Energie von 10 eV registriert werden. Um ein Tiefenprofil zu erstellen, wird die Oberfläche in einem 45° Winkel mit einem Ar<sup>+</sup> Ionenstrahl (2 keV) gesputtert. Um die elektrische Aufladung der Probe zu kontrollieren, wird das Material mit einer "low electron energy flood gun" weitestgehend entladen. Die aufladungsbedingte Verschiebung von  $\Phi_s$  wird durch den Abgleich gegen einen internen Standard (C1s bei 285,0 eV) kompensiert. Die untersuchte Fläche hat jeweils einen Durchmesser von 30  $\mu\text{m}$ . Als Vergleichsmaterial wird Herasil<sup>TM</sup> SiO<sub>2</sub> (Heraeus Tenevo) verwendet, das mit der Bulkware aus dem Herstellungsprozeß identisch ist.

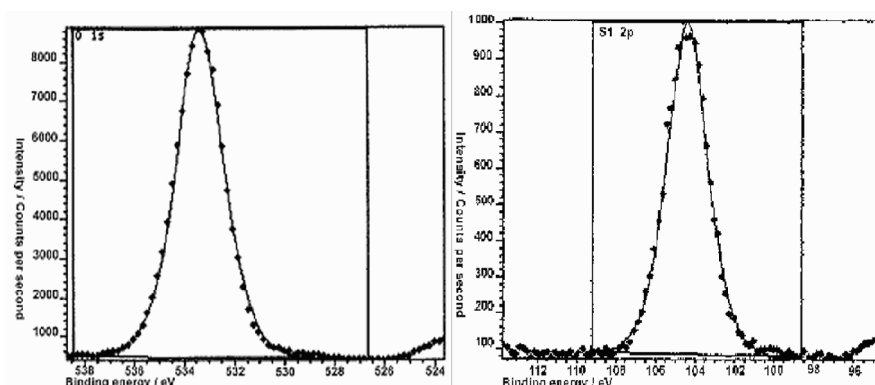


Abbildung 3.3: XPS-Spektren Herasil I: O 1s-, r: Si 2p-Orbital

Das Referenzspektrum (Abb. 3.3) zeigt jeweils einen Gauß'schen Peak für das 1s-Orbital des Sauerstoffs bei 533,5 eV und einen für das 2p-Orbital des Siliciums bei 104 eV. Es sei nochmals hervorgehoben, daß jeder Bindungszustand immer zu einem symmetrischen Peak führt. Das entsprechende Bild für die untersuchte Kieselglaskapillare weist deutliche Unterschiede dazu auf.

Im Gegensatz zu SiO<sub>2</sub> liegen auf der Kapillaroberfläche neben Siloxanen (Si-O-Si) auch Silanol-Gruppen (Si-O-H) vor, die durch Feuchtigkeitseinflüsse beim Herstellungsprozeß während des Abkühlens entstehen. In den Spektren von O und Si sollten sich asymmetrische Peaks ergeben, die durch Überlagerung von zwei symmetrischen Signalen entstehen, jeweils einer für jeden der beiden Bindungszustände.



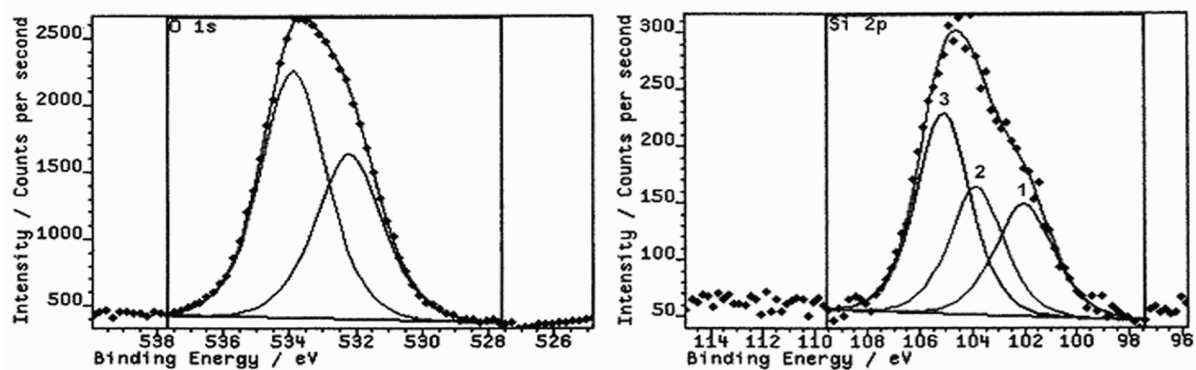


Abbildung 3.4: XPS Spektren unkontaminierte Kapillare l: O 1s-, r: Si 2p-Orbital

Das 1s-Spektrum des Sauerstoffs zeigt die erwartete Peakform (532 bzw. 534 eV), während beim Signal für das 2p-Orbital des Siliciums durch Dekonvolution drei unterschiedliche Peaks erhalten werden bei 101,5 (1), 103,3 (2) und 105 (3) eV (Abb. 3.4). Das Einzelsignal bei etwa 101,5 eV rührt von einer kovalenten Bindung zu einem deutlich weniger elektronegativeren Element als Sauerstoff her. Durch entsprechende Vergleiche kann dieses Signal einem Silan (Si-C) zugeordnet werden. Dieses Signal kann sukzessive durch Konditionieren der Kapillare mit  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Natronlauge eliminiert werden. Durch die Analyse von mehreren Proben, die parallel für die Untersuchungen vorbereitet werden, läßt sich mit großer Sicherheit ausschließen, daß die Silane Artefakte aus der Vorbereitung sind. Diese Si-C Spezies weist eine hohe hydrolytische Stabilität auf, so daß sie sich erst nach einer 6stündigen Behandlung mit konzentrierter Natronlauge beseitigen läßt.

#### 3.2.1.4 Ursprung kovalent gebundener Kohlenstoffverbindungen

Eine ursprüngliche Vermutung, daß die Verunreinigungen durch den als Schmiermittel verwendeten Graphitstaub aus dem Bohrprozeß stammen könnten, erwies sich als unzutreffend. Um den kritischen Herstellungsschritt ermitteln zu können, bei dem sich Silane bilden, muß zunächst der gesamte Herstellungsprozeß durchleuchtet werden, wobei man auf vertrauliche Informationen seitens der Hersteller angewiesen ist. Die meisten Unternehmen in dieser Branche beziehen die Kapillarrohlinge von Heraeus Tenevo. Entgegen den in der Literatur [10] beschriebenen Prozessen, wurden die Rohformen aus Kostengründen aus natürlichem Quarz hergestellt und dann aufgebohrt. Die entstehende innere Oberfläche wurde mit Flußsäure geätzt, bevor die Innenseite vergütet wird. Dies geschieht in einem chemical vapor deposition Prozeß (CVD), bei dem das Quarzrohr mit einem  $\text{SiCl}_4/\text{O}_2$  Gemisch gespült und in einer Knall-

gasflamme auf 1800°C gebracht wird. Aufgrund der bekannten Probleme ist man jedoch von diesem Vorgehen abgekommen und hat die Herstellung entsprechend auf ein outside vapor deposition (OVD) Verfahren umgestellt. Diese Rohkapillare wird anschließend in mehreren Schritten ausgezogen, wobei sie auf ein Format von 26 mm O.D. und 14 mm I.D. gebracht wird.

Die Rohkapillaren gelangen in den Handel und werden dann von den verschiedenen Produzenten von CE- und GC-Kapillaren weiterverarbeitet. In einem einleitenden Prozeßschritt wird die Rohform beispielsweise mit Trockeneis gereinigt, bevor letzte Verunreinigungen in einer reinen O<sub>2</sub> Atmosphäre verbrannt werden. Vor dem eigentlichen Ziehprozeß müssen einige Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Dazu gehören das Füllen der Kapillare mit einem inerten Schutzgas und die Versiegelung von einem der Enden. Das zweite Ende muß offen bleiben, um während des Prozesses den Gasdruck in der Kapillare zu steuern. Das Schutzgas hat zum einen die Aufgabe, das Kollabieren des Hohlkörpers zu verhindern, zum anderen soll die Bildung von Stickoxiden verhindert werden. Letztere beeinflussen den Anteil der Siloxan-Funktionen und machen eine Kontrolle der Oberflächenaktivität unmöglich. Im Idealfall verwendet man 99,99999% reines Argon und verschließt das Ende mit konischen Kieselglas-Endcaps. Andere Verfahren wie das Abschmelzen in einer Flamme oder im Lichtbogen begünstigen das Eindringen von N<sub>2</sub> aus der Umgebungsluft, das zur Bildung der unerwünschten Stickoxide führt. Der zweite kritische Punkt ist die Zuleitung des Schutzgases. Dieses kann aus Kostengründen von minderer Qualität sein. Dann können Verunreinigungen in das System eingeschleppt werden. Daneben können auch flüchtige Bestandteile aus den Schmierölen der Pumpensysteme in das Schutzgas gelangen. Das resultierende Gemisch entwickelt sich unter den Prozeßbedingungen zu einem „witches brew“, dessen Auswirkungen bei optischen Bauelementen für hochenergetische Laser [38] noch weitaus fatalere Folgen hätte als bei GC- und CE-Kapillaren [39].

Die Chemie der Kapillaroberflächen ist komplex und noch nicht vollständig erforscht, insbesondere in Bezug auf den Herstellungsprozeß und die hohen Temperaturen, bei denen der Werkstoff Siliciumdioxid bearbeitet wird. Berücksichtigt man die Empfindlichkeit des  $\zeta$ -Potentials gegenüber Verunreinigungen aller Art auf der Innenoberfläche, kann diese Grundlagenforschung zu einem besseren, allgemeinen Verständnis

beitragen. Dies betrifft nicht nur allgemein Probleme, die mit der Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Flächen zusammenhängen. Im Speziellen könnten sie auch das Verständnis von Wechselwirkungen der Proteine mit der Kapillaroberfläche verbessern.

### **3.3 Beschichtungen**

Die Modulation des elektroosmotischen Flusses kann unter verschiedenen Aspekten notwendig sein. Neben einer Verbesserung der Trennleistung durch längere Migrationszeiten lassen sich die Wechselwirkungen zwischen den (kationischen) Analyten und der Kapillarwand reduzieren, welche bei pH-Werten oberhalb von 2,5 deutliche Probleme hervorrufen [14]. Sobald sich ausreichend große  $\zeta$ -Potentiale auf der Oberfläche ausbilden, besitzt die Kapillarwand Eigenschaften eines Kationenaustauschers mit etwa einer Bindungsstelle für Kationen pro  $\text{nm}^2$  [40]. Um die Interaktionen kontrollieren zu können, hat man verschiedene Ansätze entwickelt, um die Adsorption z.B. von Proteinen zu vermindern. Man versucht dies dadurch zu erreichen, indem man durch Zusatz von verschiedenen Aminen,  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen oder Phosphaten das Oberflächenpotential vermindert [17] und die Reichweite der Coulomb-Kräfte, welche für die kaum reversiblen Interaktionen hauptsächlich verantwortlich sind, auf ein Minimum reduziert.

#### **3.3.1 Einteilung der Beschichtungen**

Im Bereich der CE versteht man unter einem Coating die Beschichtung der Kapillaroberfläche mit sogenannten Modifiern, welche die physikochemischen Eigenschaften des Kieselglases verändern. Auf der einen Seite lassen sich die Silanol-Gruppen durch kovalente Verankerung von sogenannten Modifiern gegenüber der Elektrolytlösung abschirmen, so daß im Idealfall der Potentialabfall innerhalb der Beschichtung erfolgt. Auf der anderen Seite gibt es die dynamischen Beschichtungsmethoden, die mit Zusätzen arbeiten, die durch ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen oder andere Mechanismen reversibel an die Kieselglasoberfläche gebunden werden. Die Entscheidung, ob permanente oder dynamische Beschichtungen eingesetzt werden, richtet sich nach den speziellen Anforderungen des bestehenden Trennproblems. Beide Verfahren besitzen Vor- und Nachteile, so daß in bestimmten Bereichen, wie der CIEF, auch eine Kombination aus beiden vorteilhaft ist.

### 3.3.2 Dynamische Beschichtungen

Bei dynamischen Beschichtungen erfolgt keine kovalente Verankerung der Modifier an der Glasoberfläche. Die Stabilität der Beschichtung ist prinzipiell schlechter als bei dem permanenten Pendant, da die Modifier nur durch Coulomb Kräfte und/oder Wasserstoff-Brückenbindungen an die Oberfläche gebunden werden. Somit muß weniger Energie aufgebracht werden, im Vergleich zu kovalent gebundenen Beschichtungen, um die Wechselwirkungskräfte zu überwinden. Bei der dynamischen Variante lassen sich Additive auch dadurch auf dem Trägermaterial immobilisieren, indem entweder die Löslichkeit der molekularen Polymere überschritten wird, oder sie unter Wärmeeinwirkung in schlechter solvatisierbare Modifikationen überführt werden. Sie müssen daher entweder in regelmäßigen Abständen durch Spülschritte rekonstituiert werden oder man setzt die Modifier als Teil des Hintergrundelektrolyten ein. Das dynamische Beschichten hat einige Vorteile im Vergleich zu den kovalenten Verfahren. Es treten keine hydrolysebedingten Abbauprozesse auf [41]. Dynamische Beschichtungen lassen sich mit geringerem finanziellen und zeitlichen Aufwand einsetzen und können leichter reproduziert werden als nicht kommerzielle, an die Oberfläche gebundene Modifier [42]. Außerdem lassen sich die Migrationszeiten und Peakformen besser von Kapillare zu Kapillare übertragen [43]. Als dynamische Coatings können sowohl niedermolekulare Substanzen (z.B. Mono-, Di- und Oligoamine, Sulfonsäureamine) als auch Polymere (LPA, Tween 20, Brij 35, Cellulose) eingesetzt werden. Zu den Nachteilen der gelösten Zusätze gehört die Inkompatibilität mit bestimmten massenspektrometrischen, online gekoppelten Verfahren, da sie zu einer Kontamination der Ionenquelle führen [44][45]. Sie beeinflussen auch die Empfindlichkeit bei der UV/Vis-Detektion in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und der verwendeten Wellenlänge. Daher werden die Auswahlmöglichkeiten bei dynamischen Beschichtungen deutlich stärker durch die Eigenschaften der zu trennenden Analyten beschränkt.

#### 3.3.2.1 Hochmolekulare Modifier

Bei der Verwendung von hochmolekularen Modifiern zur dynamischen Beschichtung ist es wichtig, ein ausgewogenes Verhältnis zwischen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften der Zusätze zu finden. Ist der Modifier zu gut wasserlöslich, läßt sich das Coating partiell durch Wassermoleküle von der Kieselglasoberfläche verdrängen. Die

Folge ist, daß lokal Silanol-Gruppen zugänglich werden, welche zu einer Anlagerung der Analyten beitragen. Wählt man zu hydrophobe Zusätze für die dynamische Beschichtung, steigt das Risiko, daß Proteine über van-der-Waals-Kräfte adsorbieren, die zwischen unpolaren Arealen auf der Oberfläche des Analyten und der Kapillaroberfläche auftreten können. Im Extremfall können zusätzlich Probleme durch die zunehmenden Oberflächenspannungen zwischen Puffer und Beschichtung auftreten, da die Grenzflächenenergie an der Phasengrenze zunimmt und zu einem metastabilen, energiereichen Zustand führt. In diesem Fall reichen schon geringe Mengen an Tensiden, beispielsweise auch Proteine, um die Beschichtung von der Kapillarwand abzulösen [46]. Derartige Probleme lassen sich leicht an asymmetrischen Peakformen und schlecht reproduzierbaren Migrationszeiten erkennen.

Die Optimierung von dynamischen Beschichtungen zielt auf die Auswahl der richtigen chemischen Strukturmerkmale ab, wobei neben verschiedenen Cellulosederivaten (Methyl-, Hydroxyethyl-, Hydroxypropylmethylcellulose) häufig auch unterschiedliche Polyacrylamide (lineares Polyacrylamid, poly-Hydroxyethyl-, poly-Dimethyl-, poly-Diethylacrylamid, etc.), Polyethylenglykole (Tween, Brij) und Polyvinyle (PVA, PVP) verwendet werden [47][48]. Neben diesen neutralen Substanzen werden auch zwitterionische Verbindungen verwendet, die aufgrund von ionischen Wechselwirkungen adsorbieren. Die Kapillaroberfläche erscheint dann nach außen hin unpolar, wenn die Reste des Modifiers aus langen Alkylresten bestehen. Finden hingegen kationische Tenside wie Cetyltrimethylammoniumbromid Verwendung, bilden sich bereits bei Konzentration im Bereich von wenigen  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Doppelschichten des Tensides auf der Oberfläche aus, wobei der EOF invertiert wird [49].

### **3.3.2.2 Niedermolekulare Modifier**

Niedermolekulare Modifier beeinflussen die effektive Ladungsdichte auf der Kapillaroberfläche, indem sie die Silanole durch Ausbildung von ionischen und van-der-Waals-Wechselwirkungen, als auch von Wasserstoff-Brückenbindungen maskieren. Dadurch wird unter isohydrischen Bedingungen sowohl das  $\zeta$ -Potential als auch die Ionenstärke des Puffers verändert. Eine der Folgen ist, daß die Debye-Länge vermindert und die Tendenz der Analyten, an der Kapillare zu adsorbieren, reduziert wird. Als besonders effizient haben sich mono-, bi- und oligofunktionelle Amine, quartäre Ammoniumverbindungen und Tenside erwiesen. Obwohl die Oberfläche, aufgrund

der zwischen den Ammoniumfunktionen wirkenden Abstoßungskräfte [50], nicht vollständig belegt werden kann, haben sich Polyamine wie Spermin, Spermidin oder Tetraethylenpentin als hochwirksame Modifier herausgestellt [51].

#### 3.3.2.3 Effizienz dynamischer Beschichtungen

Durch die Vielzahl der verschiedenen Beschichtungsmaterialien stellt sich unweigerlich die Frage nach der Effizienz der in der Literatur beschriebenen Materialien. Um die Wirksamkeit der Modifier vergleichen zu können, ist in der Arbeitsgruppe um Righetti ein Vergleichstest entwickelt worden, bei dem die Fähigkeit, die Proteinadsorption zu vermindern, bestimmt wird. Als Bezugsgröße dienen unbeschichtete Kapillaren, auf deren Oberfläche Fluoreszenz-markierte Proteine gezielt adsorbiert werden. Die gebundenen Proteine werden in einem zweiten Schritt durch Natriumdodecylsulfat (SDS) in micellarer Form von der Oberfläche gewaschen, wobei SDS als eines der potentesten Detergenzien in diesem Bereich eingestuft wird. Die so ermittelte Proteinmenge wird als Grundwert festgelegt. Das gleiche Experiment wird in dynamisch beschichteten Kapillaren bei unterschiedlichen Konzentrationen der anti-adhäsiven Zusätze wiederholt und die jeweilige Menge an desorbierbarem Protein ermittelt. Trägt man den Quotienten  $Q_{ads}$  (Gl. 24) gegen die Konzentration des Modifiers auf, erhält man als Kenngrößen jeder Beschichtung die Konzentration bei halbmaximaler und 90%iger Reduktion der Proteinadsorption [48].

$$Q_{ads}(x) = \frac{AU_{coat}(A)}{AU_{bfs}(A)} \quad \text{(Gl. 24)}$$

$Q_{ads}(x)$ : Adsorptionskoeffizient der Beschichtung bei einer Konzentration  $x$   
 $AU_{coat}$ : Peakfläche des desorbierten Proteins A bei der Konzentration  $x$  des Modifiers  
 $AU_{bfs}$ : Peakfläche des desorbierten Proteins A in unbeschichteten Kapillaren

#### 3.3.3 Kovalente Beschichtungen

Der Einsatz von permanenten Beschichtungen hat in der CE bereits früh an Bedeutung gewonnen, und ist untrennbar mit den Arbeiten von Hjertén et al. verbunden [21]. Bei der Trennung von anionischen Analyten lassen sich die Methoden durch die Eliminierung des EOF hinsichtlich der Trennleistung und Analysenzeiten optimieren. Von größerer Bedeutung ist aber die Kontrolle der Oberflächeneigenschaften und damit der Elektroendosmose, wenn Makromoleküle, insbesondere Proteine, als Analyten im Fokus der Untersuchungen stehen. In der CZE ist es notwendig, den Einfluß

der Silanol-Gruppen auf das Adsorptionsverhalten der Proteine zurückzudrängen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten [14]. Das gilt in noch deutlicherem Maße für die CIEF. Bei diesem Verfahren bringt eine negativ geladene Oberfläche deutliche Nachteile. Neben den unvermeidlichen ionischen Wechselwirkungen führt die unkontrollierte Elektroendosmose dazu, daß unter Umständen Analytenbanden noch vor dem Abschluß des Fokussierungsprozesses den Detektor passieren. Zusätzlich liegt durch den pH-Gradienten ein diskontinuierlicher EOF mit den damit verbundenen Schwierigkeiten vor [52]. Außerdem führt der EOF bei Proteinen mit saurem IP zu einer langsameren Mobilisierung mit der Konsequenz, daß deren Analytenzonen stärker verbreitert werden als die von basischen Zwitterionen.

Zu den ersten Beschichtungen, die erfolgreich etabliert wurden, gehört lineares Polyacrylamid (LPA). Daneben sind aber auch andere Materialien getestet worden wie Kohlenhydrate [53], Polyethylenglykole [54], oder aliphatische Kohlenwasserstoffe [55]. Die verschiedenen Typen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Hydrophilie/-phobie, sondern auch deutlich in Bezug auf das chemische Verfahren, das zur Bildung und Verankerung auf der Kieselglasoberfläche verwendet wird.

### 3.3.3.1 Oberflächenaktivierung

Die Stabilität der verschiedenen Beschichtungen ergibt sich aus dem jeweiligen Herstellungsverfahren. Sie hängt entscheidend davon ab, daß zu Beginn die Oberfläche durch eine ausgiebige Konditionierung eine gleichmäßig hohe Dichte der Silanol-Gruppen aufweist. Es ist ferner bekannt, daß isolierte OH-Gruppen deutlich reaktionsträger sind als konjugierte [56]. Insgesamt haben sich Coatings als wenig hydrolytisch stabil erwiesen, die durch eine direkte Umsetzung mit Oxiranen gebildet werden. Der Grund dafür ist darin zu sehen, daß das Kohlenstoffgerüst über Si-O-C Brücken an die Glasoberfläche gebunden vorliegt und nur sehr dichte Belegungen diese hydrolyselabilen Bindungen ausreichend schützen.

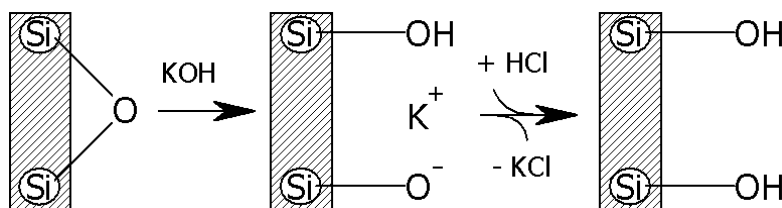


Abbildung 3.5: Oberflächenaktivierung

### 3.3.3.2 Organosilanylation

Die ersten Methoden zur Oberflächenderivatisierung wurden aus dem Bereich der HPLC zur Herstellung von Reversed phase Beschichtungen adaptiert. Die von Hjertén beschriebene und später in den BioRad Laboratories modifizierte Verfahrensweise geht von  $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan aus, das unter saurer Katalyse mit den Silanol-Gruppen kovalente Bindungen eingeht (Abb. 3.6).

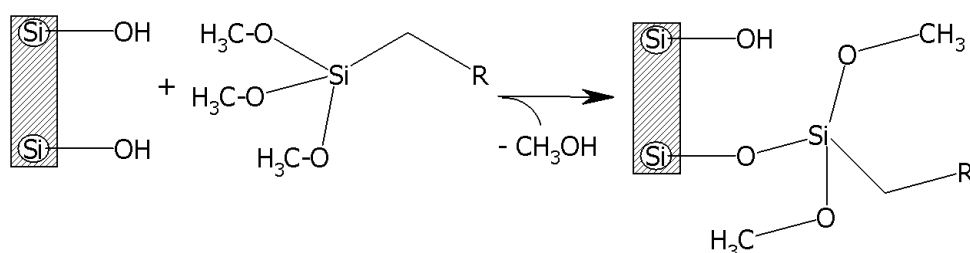


Abbildung 3.6: Organosilylierung nach Hjertén

Anschließend wird Acrylamid an die Methacrylatfunktionen des Spacers polymerisiert, wobei Ammoniumperoxosulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysatoren verwendet werden. Die Vorgehensweise wurde in verschiedenen Arbeiten modifiziert [7][53][57][58] und durch die Verwendung von Acrylamid-Derivaten an andere Trennprobleme angepaßt [17][46][59][60][61].

Die Organosilylation nach Hjertén mit  $X_3Si-R$  ( $X = OCH_3, Cl$ ;  $R =$  Kohlenstoffrest) weist den Vorteil auf, daß die Seitenkette über eine stabile Si-C Bindung auf der Kieselglasoberfläche verankert wird.

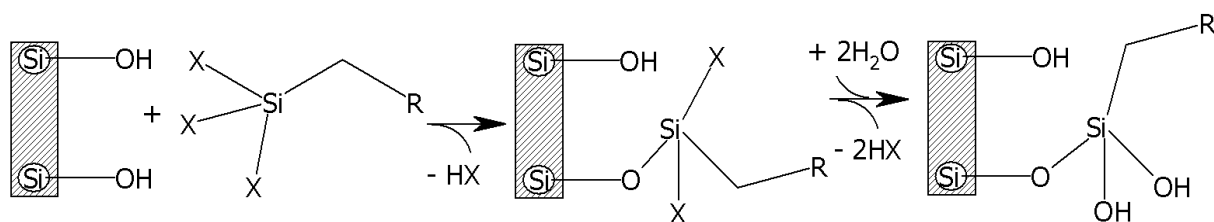


Abbildung 3.7: Organosilylation

Daneben muß berücksichtigt werden, daß Silanole nicht ausreichend aktiv sind, um das Silanisierungsreagenz mit mehr als einer Funktion kovalent zu binden. Daraus folgt, daß die Zahl der deprotonierbaren OH-Gruppen reduziert wird, diese aber nicht vollständig maskiert werden (Abb. 3.7) [62].

### 3.3.3.3 Chlorierung und Grignardierung

Ein weiteres Verfahren zur Verankerung von organischen Resten auf der Kapillaroberfläche beruht auf der Umsetzung der Silanole mit  $SOCl_2$  zu reaktiven Chlorsila-



nen. Diese werden in einem zweiten Schritt mit Lithium- oder Magnesium-organischen Reagenzien umgesetzt (Abb. 3.8). Auf diese Weise lassen sich Beschichtungen mit  $C_2$  bis  $C_{18}$ - Alkylresten relativ einfach herstellen.

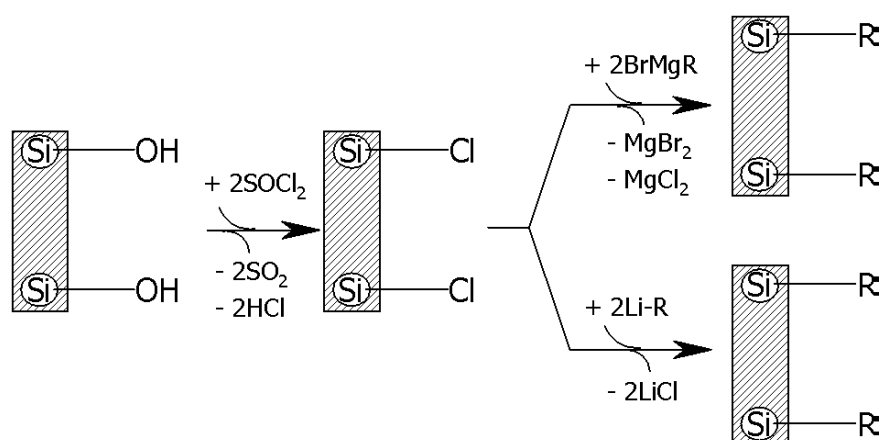


Abbildung 3.8: Halogenierung und Grignard-Rkt.

Verwendet man  $\omega$ -Alkene, können anschließend aus dem Grundgerüst mit Acrylaten noch Copolymere (z.B. Acrylamid-Derivate) synthetisiert werden, welche die eigentliche Beschichtung darstellen.

### 3.3.3.4 Hydrosilation

Von diesem Verfahren leitet sich eine andere Methode ab, bei der die Chlorsilane mit  $LiAlH_4$  in die stabileren Siliciumhydride überführt werden. Diese werden im nachfolgenden Schritt mit bi-funktionellen Olefinen unter  $H_2[PtCl_6]$  Katalyse umgesetzt (Abb. 3.9). Diese Vorgehensweise weist den Vorteil auf, daß in Abhängigkeit von der Kettenlänge deutlich dichtere Oberflächenbelegungen erreicht werden können und somit die native Oberfläche besser abgeschirmt wird [63][64].

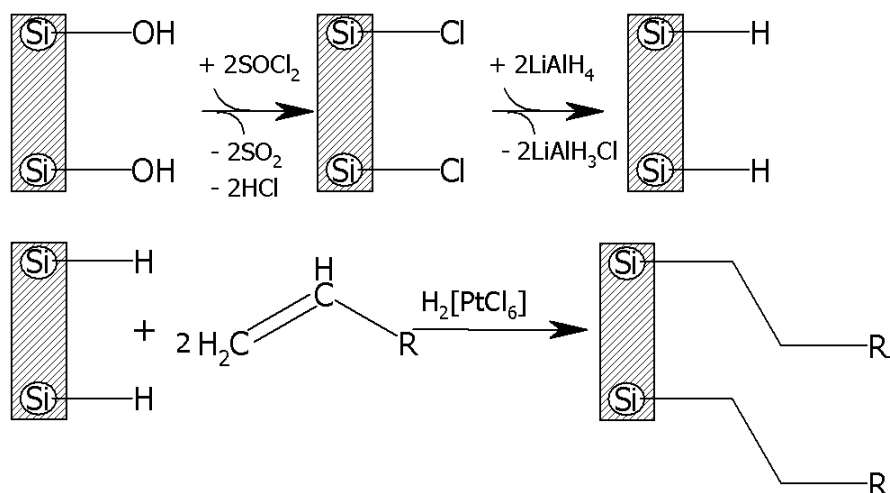


Abbildung 3.9: Hydrosilation

Zur Stabilität der Beschichtungen tragen verschiedene Faktoren bei. Eine zentrale Rolle spielt dabei, wie gleichmäßig die Belegung der Oberfläche mit organischen Substituenten erfolgt und dadurch die umgebenden Siloxane abgeschirmt werden. Es wird angenommen, daß sie der Angriffspunkt bei der Hydrolyse der Beschichtung sind [65][66]. Es ist daher von Vorteil, wenn die Spacerschicht durch Polymerisation mit einer zweiten Komponente maskiert wird, und so das Rückrad der Beschichtung gegen Hydrolyse schützt. Neue Ansätze bei der Entwicklung von permanenten Beschichtungen gehen in die Richtung, daß ein Teil der Umsetzungen außerhalb der Kapillare unter besser kontrollierbaren Bedingungen durchgeführt wird. Nur noch die kovalente Verknüpfung mit dem Trägermaterial erfolgt in der Kapillare. Dadurch ist es möglich, das Beschichtungsmaterial genauer zu charakterisieren und gegebenenfalls zu reinigen. Insgesamt lassen sich gleichmäßigere und reproduzierbarere Derivatisierungen erhalten [41]. Zusätzlich bieten sich selbst organisierende Oberflächenstrukturen (self assembled monomeric layers; SAM) neue Verbesserungsansätze [60] [62].

## 4 Kapillarisoelektrische Fokussierung

### 4.1 Allgemeine Aspekte

Die Kapillarisoelektrische Fokussierung läßt sich in allen Bereichen einsetzen, bei denen ausreichend lösliche, zwitterionische Analyten untersucht werden sollen. Zu den wichtigsten Bereichen gehören [67]:

- Bestimmung von isoelektrischen Punkten (IPs) und Quantifizierung unbekannter Proteine
- Analytik von Oligopeptiden
- Analytik komplexer Matrices / Mikroheterogenität von Proteinen
- klinische Diagnostik
- Qualitätskontrolle / Stabilitätsuntersuchungen.

Gerade im letztgenannten Bereich stellt die CIEF ein wichtiges Werkzeug in der Qualitätskontrolle von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln dar. Beispielsweise ermöglicht sie es aufgrund ihrer Leistungsfähigkeit (vgl. Kapitel 1.3), monoklonale Antikörper zu trennen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz nur wenig unterscheiden [68] [69]. Durch die Optimierung von Parametern, z.B. bei der Mobilisierung, der Zusammensetzung des Trägerampholytengemisches [70], oder durch die Verwendung von Marker-Substanzen, läßt sich die Reproduzierbarkeit von isoelektrischen Punkten und Peakflächen soweit verbessern, daß in der Qualitätskontrolle validierte CE-Methoden eingesetzt werden können [13].

Daneben ist die CIEF auch in der Proteom-Forschung weit verbreitet. Dort stellt sie eine Alternative zur 2D-Gelelektrophorese dar, da sie durch Automatisierbarkeit und Miniaturisierung einen deutlich höheren Probendurchsatz ermöglicht bei gleichzeitiger Reduktion des Arbeitsaufwandes [71]. Durch die Kopplung mit Massenspektrometern wird nicht nur die Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-Detektion oder den verschiedenen Färbetechniken verbessert. Zusätzlich lassen sich durch die verschiedenen Modi der Massenspektrometrie zahlreiche Informationen über den Analyten gewinnen. Diese Vorteile kommen dann zum Tragen, wenn das Protein beispielsweise aus der komplexen Matrix einer einzelnen Zelle bzw. eines Zellverbandes stammt. Die immensen Fortschritte lassen sich durch viele bedeutsame Veröffentlichungen der vergangenen Jahre dokumentieren [72][73][74][75][76].

In den zahlreichen Publikationen findet man nur wenige Angaben zur Reproduzierbarkeit von isoelektrischen Punkten und Peakflächen. Die Werte stammen in der Regel aus der Qualitätskontrolle, wo nur kleine Meßreihen durchgeführt werden ( $n > 10$ ). Während die relative Standardabweichung (RSD) bei der Bestimmung von isoelektrischen Punkten meist unter 1% liegt, ergeben sich für die Peakflächen mit 2-13% deutlich größere Streuungen [13][69][77][78][79]. Um vergleichbare Werte für die Reproduzierbarkeit zu erhalten, wie beispielsweise in der CZE [80][81], sind allerdings noch weitere Verbesserungen notwendig.

### 4.1.1 Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit

Eines der Hauptprobleme bei der Quantifizierung in der CIEF resultiert aus den Mikroheterogenitäten der Proteine in einem Gemisch. Abb. 4.1 zeigt das CIEF-Elektropherogramm eines Proteingemisches, bestehend aus Carboanhydrase,  $\beta$ -Lactoglobulin, Myoglobin und Ovalbumin ( $\lambda = 280$  nm; exp. Daten vgl. 4.2.1). Da die Analyten neben Isoformen auch unterschiedliche posttranslationale Veränderungen aufweisen, kann nicht immer eine Basislinientrennung erreicht werden. In solchen Fällen wird die Integrationssoftware zum limitierenden Faktor, da die verwendeten Algorithmen nicht auf diese Problemstellungen optimiert wurden.

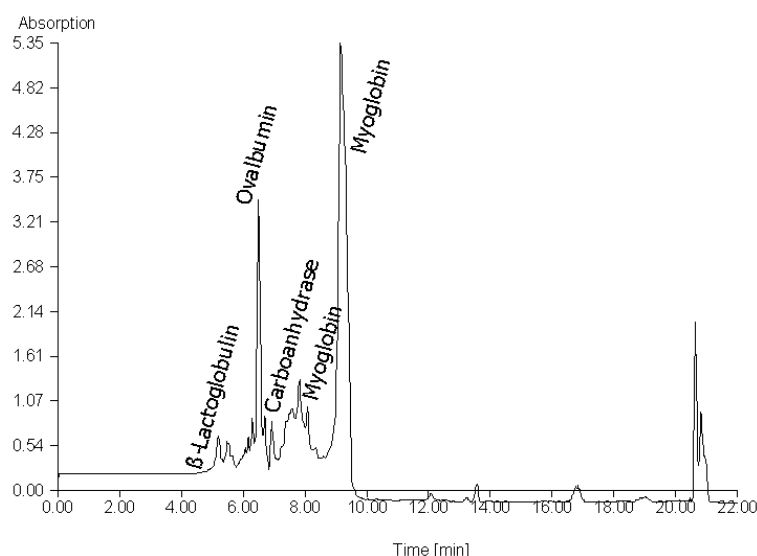


Abbildung 4.1: Elektropherogramm eines Proteingemisches

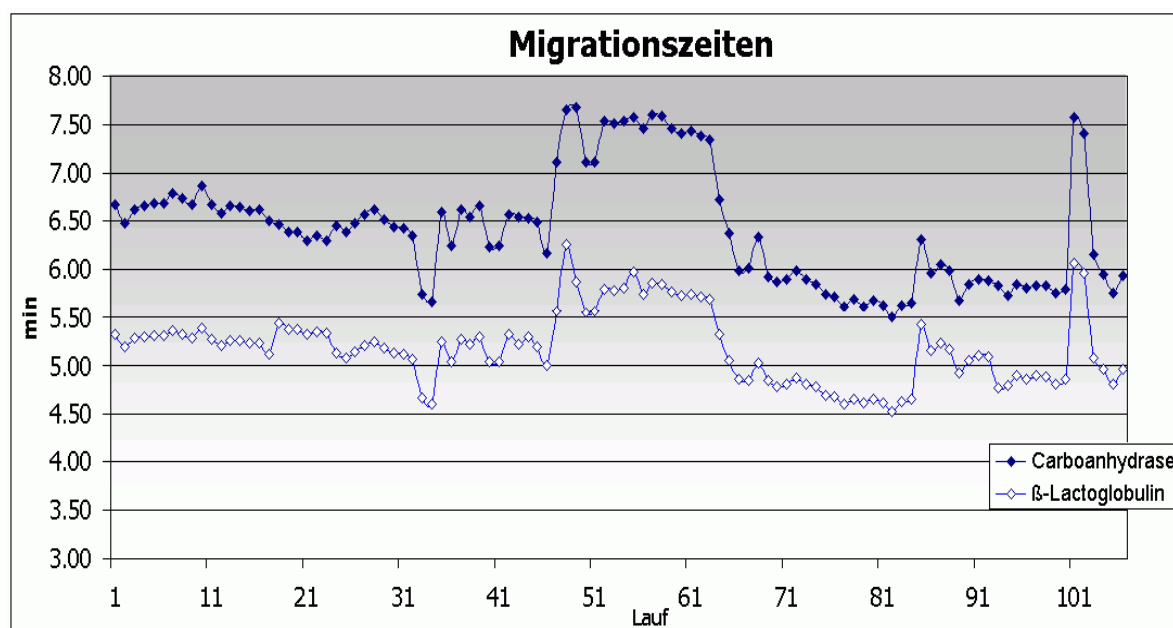
Da sich der pH-Gradient über die gesamte Kapillarlänge verteilt, ergibt sich für jedes pH-Segment eine diskrete Länge. Beim Transport der Probenzonen zum Detektor verbreitern sich die Segmente durch Diffusions-, Konvektions- und Strömungseinflüsse. Daher sind in vielen Veröffentlichungen Ansätze präsentiert worden, die durch

Optimierung des Mobilisierungsschrittes geringere Einbußen bei der Trennleistung aufweisen [14][82][83][84][85][86]. Dies betrifft sowohl die chemische als auch die hydrodynamische Mobilisierung. Während sich bei der chemisch induzierten Variante verschiedene Zusätze zum Katho- bzw. Anolyten im Vergleich zu NaCl als günstiger erwiesen haben, profitiert die hydrodynamische Form vom Einsatz viskositätserhöhender Zusätze und moderater Druckgradienten.

Durch die Optimierung des kritischen, systemimmanenten Mobilisierungsschrittes läßt sich die Reproduzierbarkeit allgemein verbessern, jedoch berücksichtigen diese Ansätze keine Faktoren, welche die Reproduzierbarkeit im Hinblick auf lange Meßserien und Analysenzeiten verbessern. Man diskutiert in diesem Zusammenhang verschiedene Gründe, wie die Langlebigkeit der Kapillarbeschichtung oder die Fällung von Proteinen in den Probenzonen. Um die Beiträge dieser Faktoren zur eingeschränkten Reproduzierbarkeit zu klären, muß jede der beiden Problemstellungen separat untersucht werden.

#### **4.1.2 Stabilität der Beschichtung**

Eine der Thesen bei der Diskussion von stark streuenden Meßwerten in langen Meßserien besagt, daß die Stabilität der Kapillarbeschichtung zu den Problemen beiträgt. Sie läßt sich mit der hydrolytischen Instabilität der kovalent gebundenen Polyacrylamid-Beschichtung unter extremen pH-Bedingungen begründen. Diese pH-Extrema liegen an den Kapillarenden vor, die in die Anolyt- ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ ) bzw. Katholyt-Lösung ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ ) eintauchen. Unter der Annahme, daß die Degradation der Beschichtung von dort aus einsetzt, müßte sich in ausgedehnten Meßreihen ein langfristiger Trend beobachten lassen. In einem Experiment mit 106 aufeinanderfolgenden Läufen wurde diese These an einem Gemisch aus vier Proteinen untersucht. Die RSD beträgt für die Peakflächen ca. 15%, wobei die Meßwerte nicht uniform über den gesamten Zeitraum der Untersuchung streuen. Vielmehr wechseln sich Phasen mit relativ großen Streuungen der Meßwerte mit solchen Bereichen ab, in denen gut reproduzierbare Werte erhalten werden. In Abbildung 4.2 sind die Migrationszeiten von zwei Bestandteilen des Proteingemisches graphisch dargestellt, während in Abbildung 4.3 die Peakflächen der Carboanhydrase gezeigt werden.


Abbildung 4.2: Migrationszeiten Carboanhydrase und  $\beta$ -Lactoglobulin

In kleinen Bereichen der Versuchsserie von ca. 10 Läufen lagen die RSD% für Migrationszeiten, Peakflächen und korrigierte Peakflächen sogar teilweise deutlich unter 1,3% [87].

Anhand der Meßdaten aus dieser ausgedehnten Versuchsreihe läßt sich die Annahme nicht stützen, daß eine fortlaufende Degradation der Polyacrylamid-Beschichtung die Reproduzierbarkeitsprobleme verursacht. Auch zum Schluß der Meßserie lassen sich sowohl Peakflächen als auch Migrationszeiten phasenweise gut reproduzieren. Vielmehr macht das Experiment deutlich, daß die Instabilität der Beschichtung möglicherweise zu den Problemen beiträgt, sie aber keinesfalls die Hauptursache darstellt.

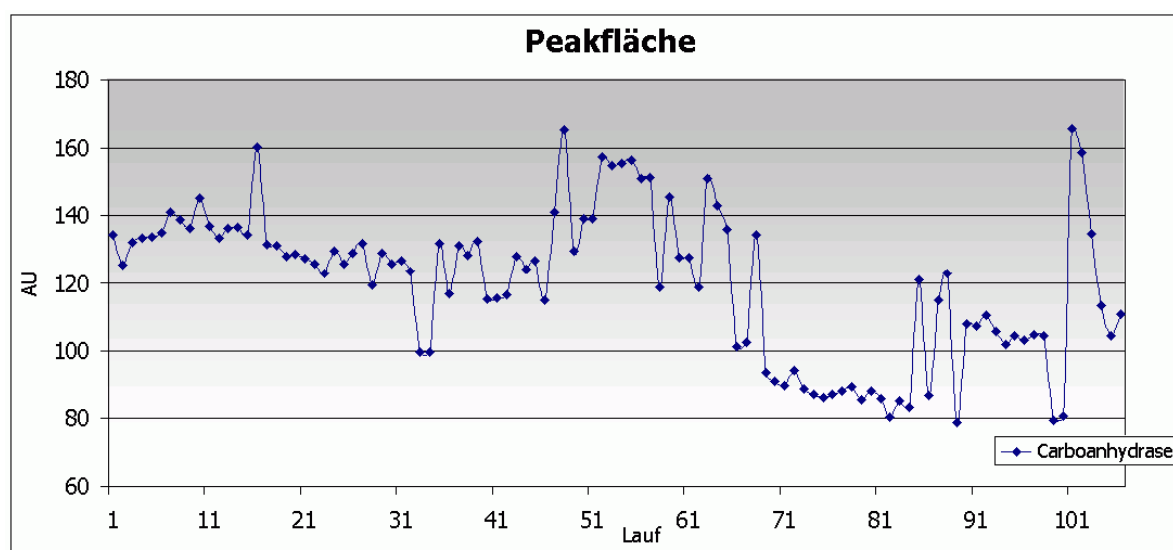


Abbildung 4.3: Peakflächen Carboanhydrase; n=106 Läufe

### 4.1.3 Proteinkonzentration und Empfindlichkeit

Ein grundsätzliches Problem der kapillarelektrophoretischen Verfahren besteht in der relativ geringen Empfindlichkeit der eingesetzten UV-Detektoren im Vergleich zu anderen Bestimmungsverfahren wie der Laser-induzierten Fluoreszenz (LIF). Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) hängen u.a. von dem Absorptionskoeffizienten des Proteins und dem Innendurchmesser der Kapillare ab und setzen eine Mindestkonzentration voraus. Geht man von der Annahme aus, daß die Proteinkonzentration in der CIEF innerhalb der Probenzone einen kritischen Wert erreicht, besteht die Gefahr, daß die Analyten ausfallen [88]. Die Analyten liegen bei dem pH-Wert in dem Kapillarsegment nach außen hin ungeladen vor. Die Abstoßung der Moleküle durch gleichnamige Ladung reduziert sich auf ein Minimum, da sowohl positiv als auch negativ geladene Bereiche auf der Proteinoberfläche existieren. In Abhängigkeit von der Konzentration steigt die Tendenz der Makromoleküle, größere Cluster zu bilden. Sie sind der Hauptgrund für die Bildung von Proteinniederschlägen.

Aus diesem Zusammenhang ergibt sich die Zielstellung, zu prüfen, ob man durch Empfindlichkeitsverbesserungen gleichzeitig die Konzentration der Analyten vermindern und die Reproduzierbarkeit in der CIEF verbessern kann.

### 4.1.4 Optimierung der Wellenlänge

In verschiedenen Veröffentlichungen werden Möglichkeiten beschrieben, die Empfindlichkeit zu verbessern, indem Laser-induzierte Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Detektoren eingesetzt werden [89][90].

Die konventionellen CIEF-Verfahren arbeiten hingegen bei einer Detektorwellenlänge von 280 nm. In diesem Wellenlängenbereich ist die Eigenabsorption der Elektrolytlösung, insbesondere durch die Trägerampholyte, sehr gering und hat deshalb keinen negativen Einfluß auf den Basislinienverlauf. Allerdings beträgt der Absorptionskoeffizient der Proteine in diesem Bereich aber nur etwa ein 1/50 bis 1/100 des Wertes, den die Analyten bei 200-220 nm aufweisen [89].

Eines der Ziele bei den Untersuchungen bestand darin, einen Wellenlängenbereich zu finden, bei dem die Differenz aus der Gesamtabsorption und der Adsorption durch die Trägerampholyte möglichst große Werte annimmt und gleichzeitig keine übermäßigen Probleme durch den Basislinienverlauf entstehen.

Das Optimum hängt primär von den Absorptionskoeffizienten ab, aber auch davon, in welchen Verhältnissen Ampholyte und Proteine zueinander im jeweiligen Kapillarsegment vorliegen. Folgende Punkte müssen in die Überlegungen einbezogen werden:

- a) Wellenlänge  $\lambda$  mit  $\Delta A(\lambda) := \max$ .
- b) systematische Fehler durch Absorption der Ampholyte
- c) Limitierung durch die Integrationssoftware / Algorithmen.

## 4.2 Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit

### 4.2.1 Konventionelle CIEF-Methode

Als Ausgangspunkt für die CIEF-Experimente dient eine Methode, welche auf einem SpectraPhoresis 500 CE-Gerät (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) erfolgreich etabliert wurde. Im Gegensatz zu den meisten Veröffentlichungen handelt es sich um eine Ein-Schritt-Methode, die auf einer Mobilisierung durch den Rest-EOF [91] in einer mit LPA kovalent beschichteten Kapillare beruht ( $50\text{ }\mu\text{m}$  I.D.,  $l_{\text{ges}} = 30\text{ cm}$ ,  $l_{\text{det}} = 22\text{ cm}$ ). Die einzelnen Lösungen werden wie in Kapitel 7.6.1 beschrieben, hergestellt. Nach dem Spülen mit der Blindlösung wird die Kapillare mit der Probenlösung gefüllt. Diese enthält neben dem Protein 2% (v/v) Pharmalyte 3-10<sup>TM</sup> und 0,8% (m/V) Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). Die Fokussierung erfolgt bei 25°C und 7,5 kV unter Verwendung von  $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  als Anolyten und  $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH als Katholyten. In vorausgegangenen Experimenten mit je 10 Läufen wurden die isolierten Analyten des Proteingemisches untersucht (Abb. 4.4). Im Fall von Myoglobin (IP 7,0 bzw. 7,4;  $0,3\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $\lambda = 280\text{ nm}$ ) ließen sich die Peakflächen von Haupt- und Nebenkomponente mit 1% bzw. 1,9% RSD gut reproduzieren.

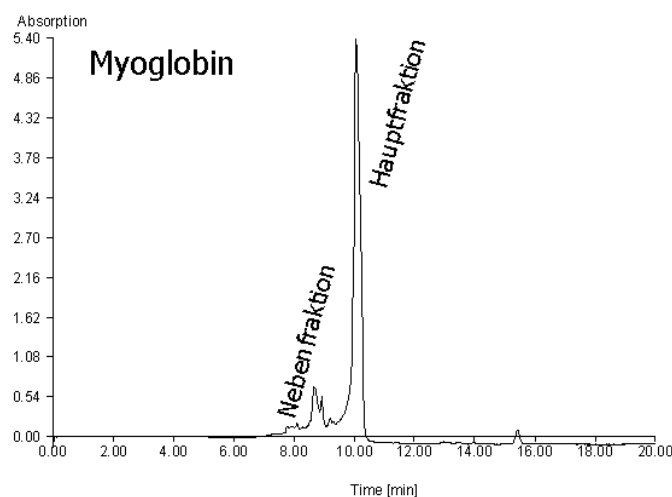


Abbildung 4.4: Myoglobin CIEF Elektropherogramm



## 4.2.2 Optimierung der CIEF-Methode

### 4.2.2.1 Gerätebedingte Modifikationen

Beim Transfer der Methode vom SpectraPhoresis 500 Gerät auf das P/Ace MDQ System müssen einige Parameter in der Methode verändert werden. Dies betrifft vor allem die Kapillarlänge, da unterschiedliche Kassettensysteme verwendet werden. Während die effektive Kapillarlänge von 22 cm auf 23 cm steigt, nimmt die Gesamtlänge um 4 cm auf insgesamt 34 cm zu. Gleichzeitig wird die Fokussierungsspannung auf 8 kV erhöht. Durch diese Maßnahme wird die Feldstärke um 6% vermindert, um der zusätzlich entstehenden Wärme Rechnung zu tragen. Aufgrund einer Beschränkung in der Steuerungssoftware des P/Ace MDQ Systems wird der Injektionsdruck von 900 auf 1035 mbar erhöht, um das Produkt aus Druck und Zeit konstant zu halten. Zusätzlich wird anstelle eines UV-Detektors ein Photodiodenarray-System verwendet.

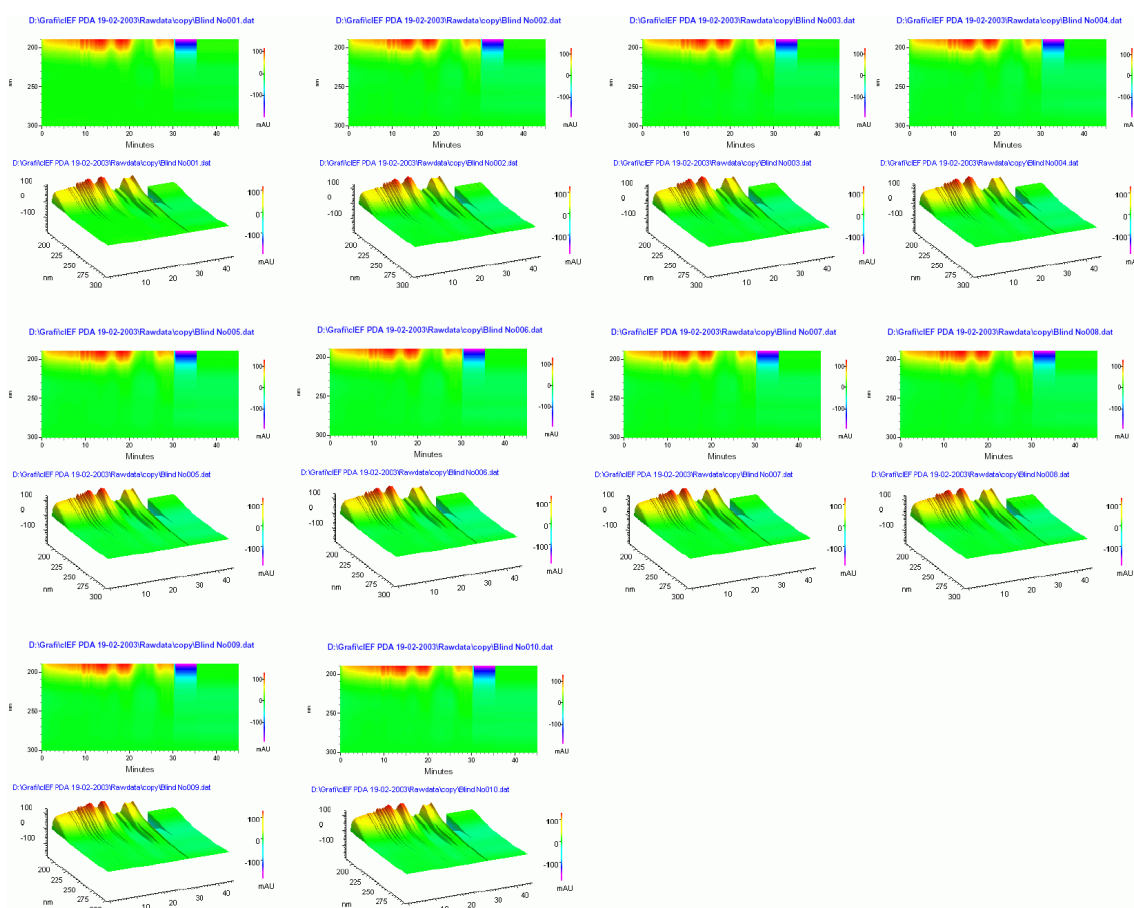


Abbildung 4.5: 3D-Spektren Hintergrundsignal der Ampholyte  $\lambda = 200\text{-}300\text{ nm}$

In einem Kontrollexperiment mit insgesamt 10 aufeinander folgenden Läufen wird die Blindlösung mit 2% (v/v) Pharmalyte 3-10<sup>TM</sup> und 0,8% HPMC (m/v) fokussiert.

## 4 Kapillarisoelektrische Fokussierung

Die Datenaufnahme beinhaltet sowohl den 30minütigen Fokussierungsschritt, als auch anschließendes Spülen der Kapillare mit Wasser (5 min) und Blindlösung (10 min; vgl. Kap. 7.6.2). Um Informationen über den für Optimierungsversuche relevanten Wellenlängenbereich von 210 bis 280 nm zu sammeln, wird das UV-Spektrum zwischen 200 und 300 nm aufgezeichnet. Die entsprechenden 3D-Spektren der Läufe sind in Abb. 4.5 von links nach rechts abgebildet.

Dieser Versuch zeigt, daß die Basislinie oberhalb von etwa 250 nm Wellenlänge nicht nennenswert durch die Trägerampholyte beeinträchtigt wird. Außerdem ist das Hintergrundsignal, auch im kurzwelligen Bereich, sehr gut reproduzierbar. Im Bereich bis etwa 220 nm nimmt die Absorption langsam zu, um im noch kürzerwelligen auf über 100 Milli-Absorptionseinheiten (mAU) anzusteigen. Basierend auf diesen Ergebnissen sind verschiedene Wellenlängen für die weiteren Versuche ausgewählt worden. Das Spektrum wird im kurzwelligen Bereich bei  $\lambda = 214$  nm begrenzt (vgl. Abb. 4.6). Jenseits dieser Wellenlänge liegen die Schwankungen der Basislinie über 40 mAU. Größere Schwankungen werden als inakzeptabel eingestuft, da die Integrationssoftware diese zusätzliche Herausforderung bewältigen muß, was letztendlich zu Lasten der Präzision geht.

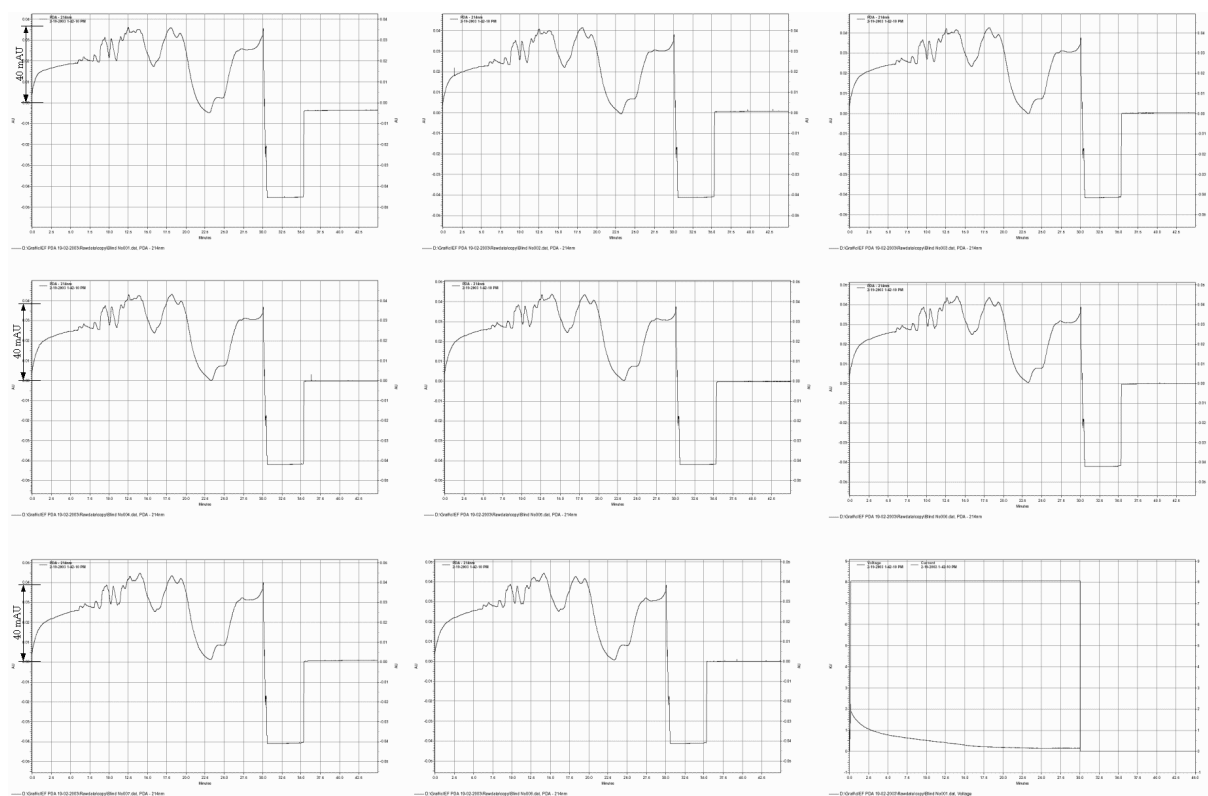


Abbildung 4.6: Hintergrundsignal der Ampholyte  $\lambda = 214$ nm sowie Spannung/Stom-Zeit-Diagramm

Weiterhin werden Spektren bei 230 und 254 nm zum Vergleich mit der Standardwellenlänge von 280 nm aufgenommen. Im direkten Anschluß an den Vorversuch wird eine Meßserie mit einem Gemisch aus Myoglobin ( $1,08 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\beta$ -Lactoglobulin ( $1,97 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) und Ovalbumin ( $3,90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) durchgeführt. Die Konzentrationen sind im Vergleich zur Methode unter 4.2.1 geringfügig vermindert worden. Während sich bei 280 nm vergleichbare Spektren zu Abb. 4.1 ergeben, erkennt man bei  $\lambda = 214 \text{ nm}$  (Abb. 4.7) eine starke Verbreiterung der Peaks, bedingt durch die höheren Absorptionskoeffizienten. Um die unterschiedlichen Maßstäbe in den Abbildungen 4.6-4.8 auszugleichen, ist in Abb. 4.7 das Intervall von 40 mAU an der Ordinate eingezeichnet. Das UV-Spektrum der Trägerampholyte wird von den Signalen der Analyten deutlich überlagert, so daß bei dieser Wellenlänge genügend Raum vorhanden ist, um die Konzentration der Analyten reduzieren zu können.

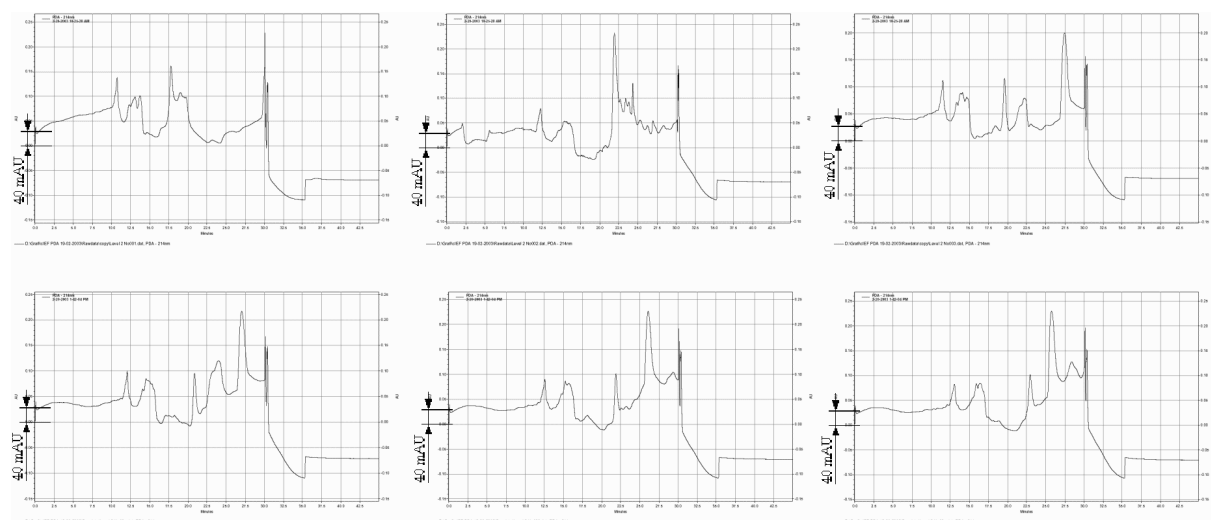


Abbildung 4.7: CIEF Läufe 1-6,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ , im Anschluß an Abb. 4.6

Während in Abb. 4.7 die ersten sechs Läufe der Meßserie dargestellt sind, zeigt Abb. 4.8 die Läufe 10, 15 und 20. Die Elektropherogramme dokumentieren die Probleme bei der Reproduktion von Peakmustern. Die Meßserie zeigt aber auch, daß diese Schwierigkeiten innerhalb von einigen Läufen auftreten und daher Instabilitäten der Kapillarbeschichtung von untergeordneter Bedeutung sind.

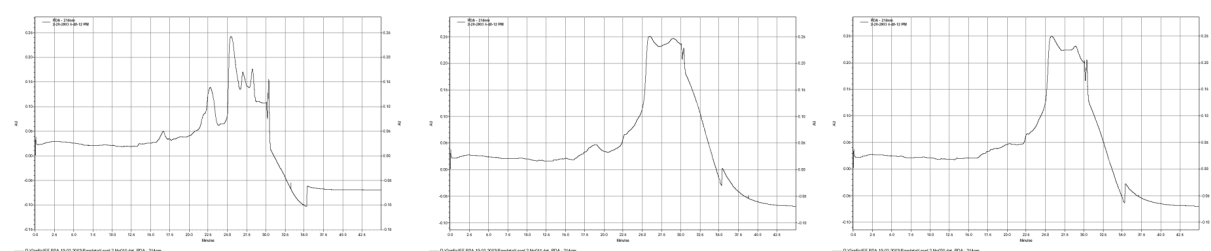


Abbildung 4.8: CIEF Läufe 10, 15, 20,  $\lambda = 214 \text{ nm}$ , im Anschluß an Abb. 4.6 und 4.7

### 4.2.2.2 Reduktion der Proteinmengen

Aufgrund der rapiden Veränderung des Peakmusters innerhalb von wenigen Läufen kann gemutmaßt werden, daß die Ursache möglicherweise in einer Fällung der Proteine zu sehen ist. Um die Vermutung überprüfen zu können, werden aus der Protein-Stammlösung durch unterschiedlich starke Verdünnung verschiedene Proben hergestellt und nacheinander vermessen. Die pro Messung injizierten Proteinmengen sind in Tabelle 4.2.2.1 aufgelistet.

<b>V<sub>Kapillare</sub> = 648 nl / 05/02/03</b>	<b>Myoglobin</b>	<b>β-Lactoglobulin</b>	<b>Ovalbumin</b>
Elektroosmotische Mobilisierung			
Level 2	11,55 ng	22,91 ng	40,73 ng
Level 3	0,599 µg	1,092 µg	2,166 µg
Level 4	0,799 µg	1,456 µg	2,887 µg
Level 5	0,998 µg	1,820 µg	3,609 µg

Tabelle 4.2.2.2.1 Zusammensetzung der Proben in den Ein-Schritt CIEF-Experimenten

Die Läufe 1-5 sowie das Strom-Zeit-Diagramm sind in Abbildung 4.9 zusammengefaßt. Sie zeigen im Vergleich zu den Elektropherogrammen bei höheren Proteinkonzentrationen prinzipiell eine bessere Reproduzierbarkeit, mit Ausnahme von Lauf 5.

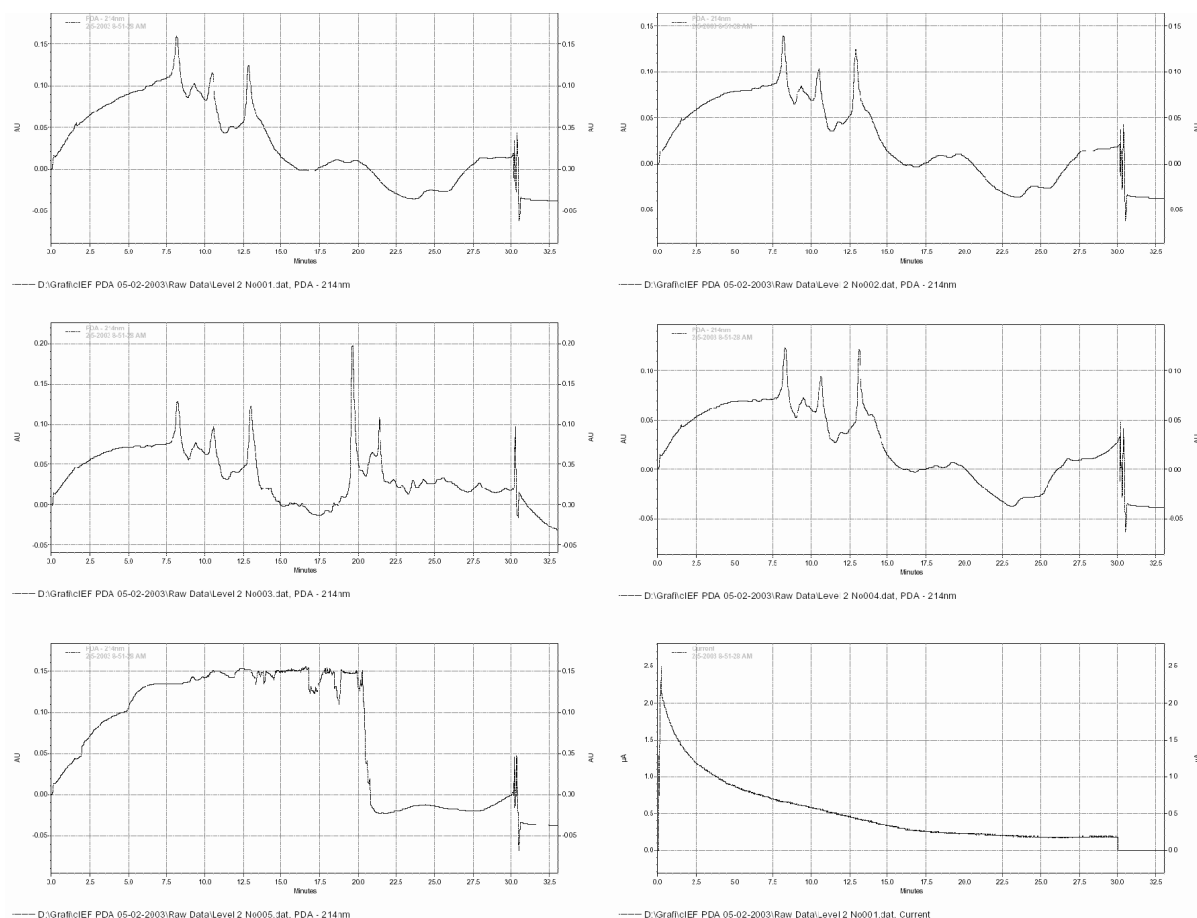


Abbildung 4.9: Level 2 Läufe 1-5 ( $\lambda = 214$  nm) und Strom-Zeit-Diagramm

Wie bei allen bisherigen Versuchen fällt die Stromstärke von initial 2,5  $\mu\text{A}$  exponentiell nach etwa 20 min auf ca. 0,3  $\mu\text{A}$  ab. Bei Lauf 3 beobachtet man einen zusätzlichen Peak nach etwa 20 min, der in anderen Elektropherogrammen der Meßreihe nicht beobachtet wird.

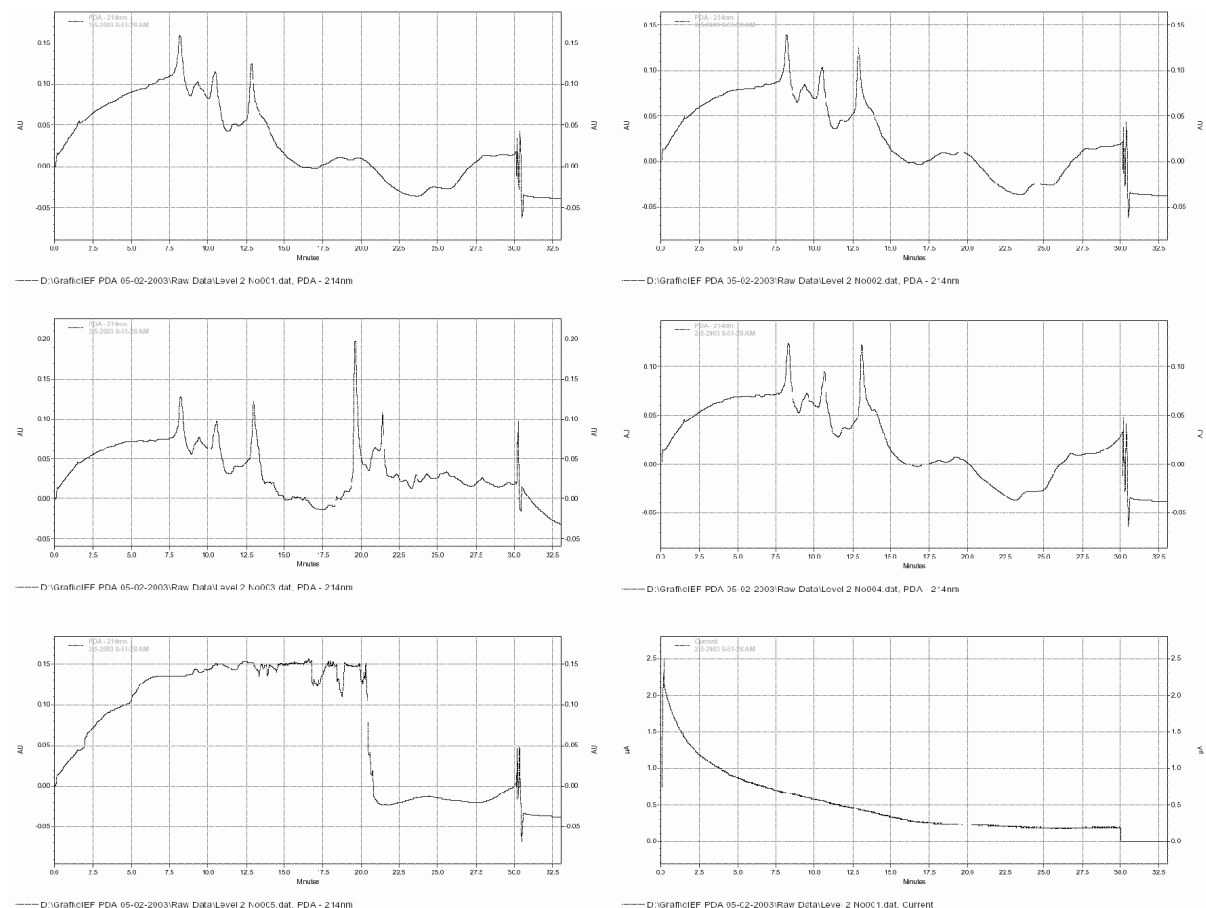


Abbildung 4.10: Level 2 Läufe 15-20 ( $\lambda = 214 \text{ nm}$ ) und Stromzeit-Diagramm

In den nachfolgenden Läufen nimmt mit zunehmender Proteinmenge die Reproduzierbarkeit des Peakmusters ab. Bei den letzten fünf Messungen (Abb. 4.10) lassen sich überhaupt keine Proteinpeaks mehr zuordnen. Aus diesem Grund wurde die Kapillare nacheinander jeweils 10 min mit Wasser und Blindlösung gespült ( $p=1034 \text{ mbar}$ ). Zu Kontrollzwecken wird anschließend die Proteinlösung gegen die Blindlösung ausgetauscht. Die bei der Fokussierung der Blindlösung erhaltenen Elektropherogramme sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Im Vergleich zu den Blindversuchen (Abb. 4.6), die vor der ersten Proteintrennung durchgeführt werden, liegt die Grundabsorption mit etwa 200 mAU um ein Vielfaches höher (s. Abb. 4.11). Außerdem verändert sich das Peakmuster von Lauf zu Lauf und weist keine Ähnlichkeiten mit dem Muster der ersten Kontrollversuche auf. Daraus muß geschlossen werden, daß die

beschriebenen Spülschritte (vgl. Kap. 7, Tab. 7.6.3 und 7.6.4) nicht ausreichen, um eine Kumulation von Analysenbestandteilen in der Kapillare zu verhindern.

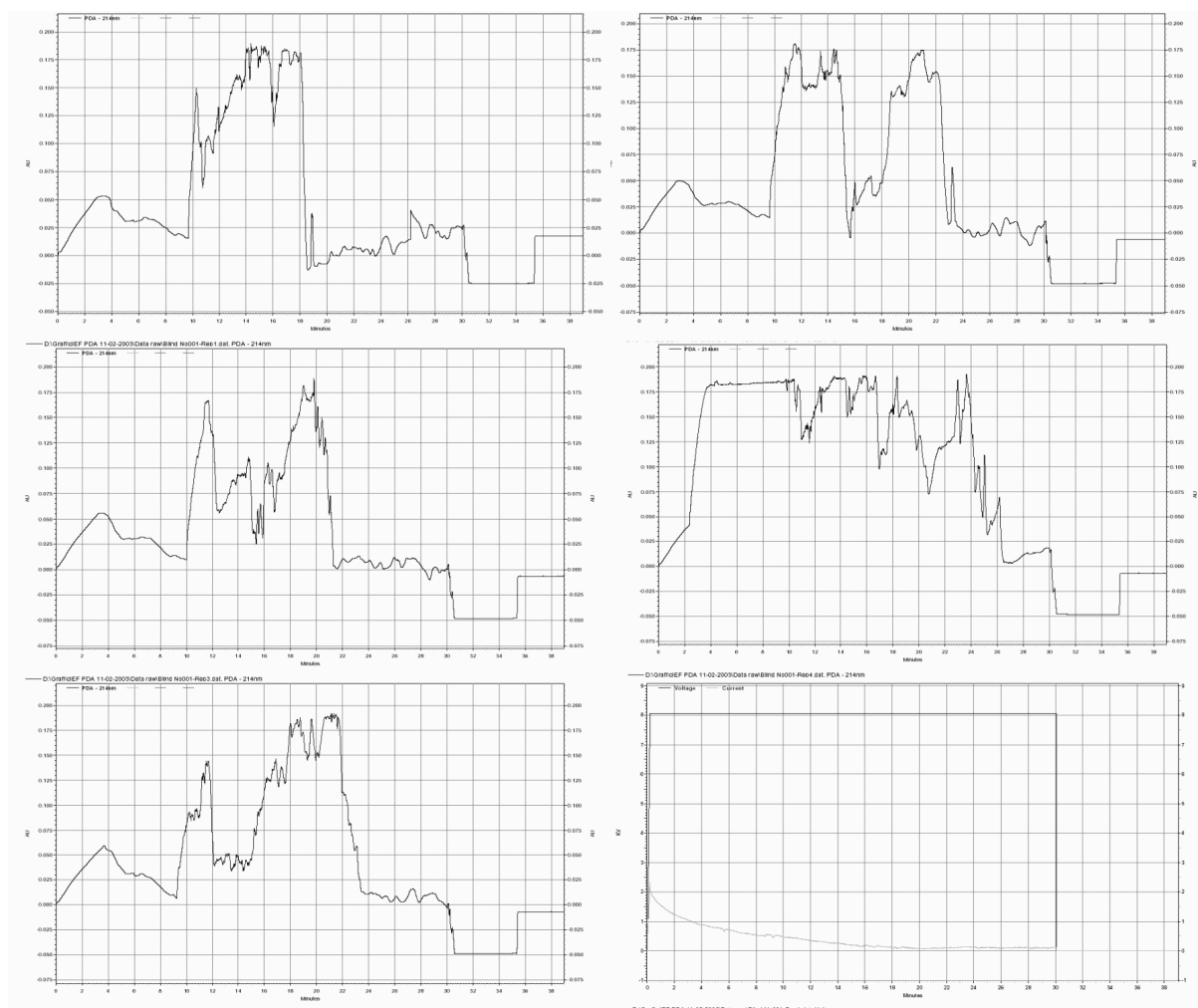


Abbildung 4.11: Kontroll-Elektropherogramme ohne Proteine,  $\lambda = 214 \text{ nm}$  sowie Spannungs- bzw. Strom-Zeitdiagramm

### 4.2.3 Vergleich mit chemischer Mobilisierung

Um abschätzen zu können, wie stark sich EOF-Schwankungen auf die Reproduzierbarkeit des Peakmusters auswirken, werden Kontrollversuche mit chemischer Mobilisierung durchgeführt. Der Fokussierungsschritt wird auf 4 min verkürzt, um zu verhindern, daß die parallel einsetzende elektroosmotische Mobilisierung die Ergebnisse zu stark beeinflusst. Die eigentliche Mobilisierung wird durch Zusatz von  $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaCl}$  zum Analyten eingeleitet. Zusätzlich werden bei der Versuchsreihe unterschiedlich konzentrierte Proteinproben verwendet, um zu überprüfen, ob auch hier konzentrationsabhängige Schwierigkeiten auftreten.

Allerdings sind die Einwaagen und Verdünnungsschritte so gewählt worden, daß die in den vorangegangenen Versuchen kritischen Proteinmengen, bei denen die größten Schwierigkeiten aufgetreten sind, nicht erreicht werden.

<b>V<sub>Kapillare</sub> = 648 nl</b>	<b>Myoglobin</b>	<b>β-Lactoglobulin</b>	<b>Ovalbumin</b>
Chemische Mobilisierung			
04/02/03 Level 1	20,19 ng	37,45 ng	76,40 ng
04/02/03 Level 2	100,93 ng	187,27 ng	382,00 ng
04/02/03 Level 3	201,85 ng	374,54 ng	763,99 ng
04/02/03 Level 4	403,70 ng	749,09 ng	1527,98 ng

Tabelle 4.2.3.1: Zusammensetzung der Proben in den Experimenten mit chemischer Mobilisierung

Auch bei der chemischen Mobilisierung läßt sich das Peakmuster nicht zufriedenstellend reproduzieren, wobei sich bei vergleichbaren Analytenmengen weniger Probleme beobachten lassen als bei der Ein-Schritt-Methode. Abbildung 4.12 zeigt vier aufeinander folgende Läufe, bei denen sich die Substanzmengen etwa zwischen 200 und 800 ng bewegen. Auffällig ist, daß die fokussierten Probenbanden erst nach 14-20 min detektiert werden, besonders wenn man berücksichtigt, daß der chemischen Mobilisierung ein vierminütiger Fokussierungsschritt vorausgeht. Bei der EOF-abhängigen Mobilisierungsart erreichen die Analyten nach 7-14 min das Detektionsfenster. Diese Beobachtung wird so gedeutet, daß die chemische Mobilisierung einerseits weniger empfindlich auf EOF-Schwankungen reagiert, andererseits die Mobilisierung deutlich langsamer erfolgt als bei der Ein-Schritt-Methode, was auf einen allgemein reduzierten EOF hinweist.

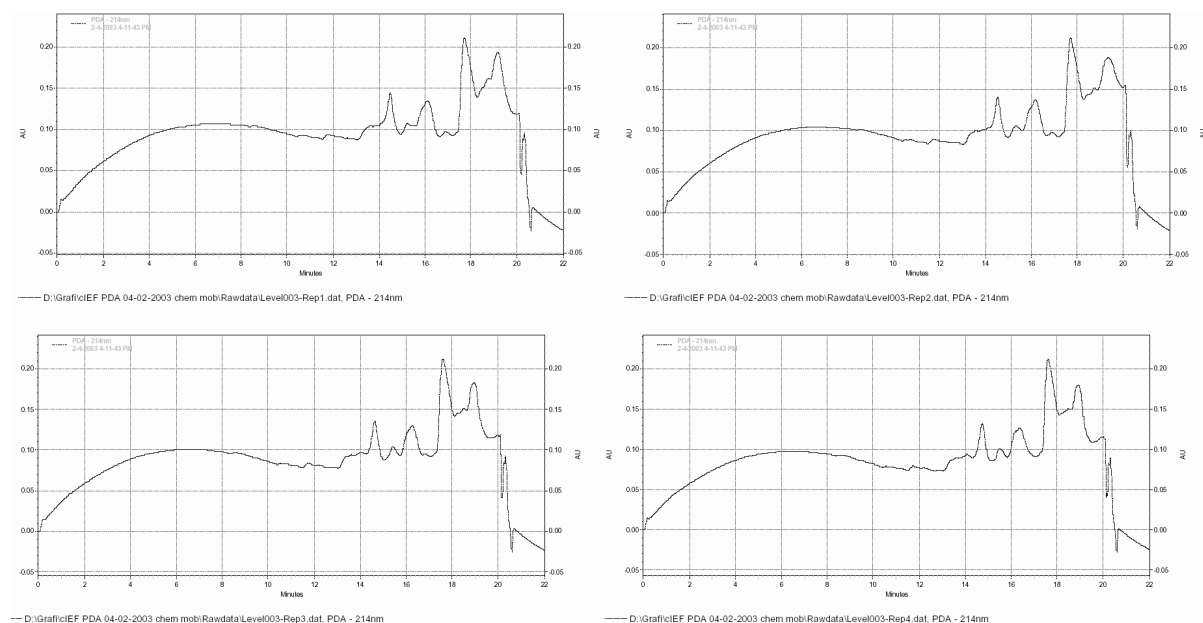


Abbildung 4.12: Elektropherogramme Läufe 9-12;  $\lambda = 214$  nm

### 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Entgegen der landläufigen Meinung, in Polyacrylamid-beschichteten Systemen sei der EOF vollständig unterdrückt, konnte in separaten Experimenten (s. Kapitel 5.6.1) belegt werden, daß lediglich eine Reduktion um etwa 90% vorliegt. Dies stimmt sowohl mit den Ergebnissen von Kohr und Engelhardt [19] als auch von Kirby und Hasselbrink Jr. [92] überein, die selbst für unpolare Materialien wie Polytetrafluoroethylen (Teflon) oder Polyvinylchlorid (PVC) einen meßbaren EOF beschreiben. Unabhängig davon haben Shih und Korte [55] ebenfalls eine Ein-Schritt-Methode in einer C<sub>8</sub>-beschichteten Kapillare etabliert.

Die Versuche, bei denen das UV-Spektrum der Trägerampholyte untersucht wurde, zeigen, daß eine Mobilisierung durch den bestehenden EOF möglich ist. Aus der Reproduzierbarkeit des Peakmasters bei den Blindversuchen vor den Fokussierungsexperimenten im kurzwelligen UV-Bereich lassen sich zwei Erkenntnisse gewinnen. Zum einen ist ein schwach ausgeprägter EOF initial vorhanden, zum anderen kann bestimmt werden, wie stark die Basislinienschwankungen durch die Hintergrundsignale der Ampholyten sind. Der von Zhu et. al. [93] publizierte Ansatz, anstelle von Marker-Substanzen bei 280 nm die UV-Spur im Bereich um 210 nm auszuwerten, ist angesichts der in 4.2.2.1 gezeigten, reproduzierbaren 3D-Spektren folgerichtig.

In diesem Zusammenhang muß der Zusatz von HPMC diskutiert werden. In der Literatur wird sowohl die Verwendung als dynamische Beschichtung als auch viskositäts erhöhender Zusatz beschrieben. Der maximal anti-adhesive Effekt wird bereits bei Zusatz von 0,01% (m/V) HPMC erreicht [47]. Die in der Literatur beschriebene Eigenschaft, die Agglomeration und Fällung von Proteinen in den Probenzonen zu unterdrücken [94], konnte unter den Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden. Sie steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Righetti. Nach deren Untersuchungen ist die Effizienz von Cellulose-Derivaten im Vergleich zu anderen Modifiern relativ gering. Im Fall von HPMC läßt sich die Adsorption maximal um 70% reduzieren. Die Verwendung als viskositätserhöhender Zusatz, der die konvektions- und diffusionsbedingte Verbreiterung der Probenzonen im Mobilisierungsschritt verhindern soll, ist bei der EOF-basierten Methode kritisch zu beurteilen. Eine zu hohe dynamische Viskosität kann die Analysenzeiten drastisch erhöhen und potentiell zu einer Verschlechterung der Reproduzierbarkeit führen. Dieses Problem äußert sich in



den Experimenten mit elektroosmotischer Mobilisierung ganz deutlich, wenn die Probenmenge eine spezifische Grenze überschreitet. Durch den Vergleich der beiden Mobilisierungsverfahren wird deutlich, daß sich die schlechtere Reproduzierbarkeit bei der Ein-Schritt-Methode aus der Abhängigkeit vom  $\zeta$ -Potential ableitet.

Zur Entstehung des Oberflächenpotentials tragen verschiedene Faktoren bei. Die Reduktion bzw. Elimination des EOF durch kovalente Beschichtungen setzt voraus, daß die pH-abhängige Dissoziation von nicht derivatisierten Silanol-Gruppen zurück gedrängt wird, oder daß das  $\zeta$ -Potential innerhalb der unendlich viskosen Beschichtung auf 0 mV abfällt (vgl. Kap. 3.3.3). Beide Annahmen lassen sich in Wirklichkeit nur selten realisieren. Weder lassen sich die Silanol-Gruppen quantitativ umsetzen, noch gänzlich durch die Beschichtung abschirmen. Da die Polyacrylamid-Ketten nicht quervernetzt sind, können sie sich gegeneinander verschieben und liegen unregelmäßig angeordnet vor. Daher kann man annehmen, daß sich die Beschichtung nicht wie ein Festkörper, sondern wie eine hochviskose Flüssigkeit verhält. Der Durchtritt von Ionen zwischen Glasschicht und Kapillarlumen wird behindert, aber nicht unterdrückt. Außerdem muß man berücksichtigen, daß die Trägerampholyte ein Gemisch von 50-150 unterschiedlichen Zwitterionen darstellen, die teilweise auch als niedermolekulare Modifier bei dynamischen Beschichtungen verwendet werden [95]. Unter der Annahme, daß sich Verteilungsgleichgewichte zwischen Lösung und LPA-Beschichtung für die Trägerampholyte einstellen, resultiert daraus eine ebenfalls geladene Grenzfläche, die zu der Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses beiträgt.

Die durchgeführten CIEF-Experimente zeigen, daß eine auf elektroosmotischer Mobilisierung beruhende Ein-Schritt-Methode auch in LPA-beschichteten Kapillaren durchgeführt werden kann. Durch die EOF-abhängige Mobilisierung der Probenzonen reagiert das System empfindlich auf Veränderungen der Kapillarbeschichtung. Dies gilt insbesondere für die Adsorption von Proteinen und Ampholyten, und erleichtert somit die Erkennung von kritischen Versuchsbedingungen.

Die Proteinadsorption konnte als eine der Hauptursachen für die schlechte Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Peakflächen in umfangreichen Meßreihen identifiziert werden. Bedingt durch den Mechanismus der CIEF kommt es zur Aufkonzentrierung der Analyten in einem kleinen Kapillarsegment. Durch die geringere Löslichkeit der Analyten unter isoelektrischen Bedingungen kann weder die Erfassungs-

noch die Bestimmungsgrenze durch eine Erhöhung der Proteinmenge verbessert werden. Vielmehr wird die Leistungsfähigkeit der Methode durch diese Maßnahme verschlechtert. Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, muß die Empfindlichkeit der Detektion verbessert werden. Durch die Verwendung eines Photodiodenarray-Detektors konnte gezeigt werden, daß die Absorption der Trägerampholyte im Bereich von 200 - 220 nm zum begrenzenden Faktor wird. Allerdings zeigen die Spektren auch, daß die Hintergrundelektrolyte bei 254 nm keinen erhöhten Einfluß auf den Basislinienverlauf haben als bei 280 nm.

Bezüglich der Trägerampholyte liegt das Optimum für die Detektion im Bereich zwischen 220 und 250 nm, wobei durch eine Verminderung der Ampholytkonzentration auf weniger als 0,2% (v/v) weitere Verbesserungen möglich sein dürften.

Gleichzeitig nimmt die Absorption der Analyten zum kurzwelligen UV-Bereich hin deutlich zu, so daß eine Reduktion der Probenmengen nicht nur möglich, sondern auch zwingend notwendig ist. Durch Vergleich der Spektren bei 214 nm in Abb. 4.6 und 4.7 wird deutlich, daß die Peaks sehr breit sind, bzw. das Detektionsfenster zu langsam passieren. Daher scheint eine geringfügige Erhöhung des EOF vorteilhaft, um schärfer begrenzte Peaks zu erhalten.

## 5 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

### 5.1 Aspekte der Proteinanalytik

#### 5.1.1 Allgemeines

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist ein Analysenverfahren, das vielfältige Einsatzmöglichkeiten bietet. Neben der Proteom-Forschung [96] ist auch die Kontrolle von Plasmaspiegeln bei Pharmaka mit geringer therapeutischer Breite ein Bereich, in dem die Trennleistung und Geschwindigkeitsvorteile der CZE ausgenutzt werden. Dies gilt insbesondere, wenn die Analyten direkt aus der Probe bestimmt werden können, ohne daß umfangreiche Aufarbeitungsschritte vorausgehen müssen [26].

Bedingt durch die Zunahme der proteinogenen Arzneistoffe stellen sich neue Herausforderungen für die Formulierung von Arzneiformen. Zu den Hauptproblemen gehört die chemische und physikalische Instabilität der Makromoleküle, die potentiell durch chemische Abbaureaktionen (Oxidation, Deamidierung, Hydrolyse, etc.) und physikalische Prozesse (Assoziation, Aggregation, Denaturierung, Adsorption) verändert werden [23]. Bei der Analytik von Proteinen stellen sich ähnliche Probleme. Neben den chemischen Abbaureaktionen, die durch die Versuchsbedingungen des Analysenverfahrens bedingt sein können, bereitet insbesondere die Adsorption an Oberflächen in der CE große Probleme. Prinzipiell läßt sich eine Analytik mittels CZE durchführen. Man nimmt dabei an [97], daß sich die gleichnamig geladenen Analyten und die Kapillaroberfläche abstoßen. Folglich ließe sich die Adsorption an Grenzflächen bei pH-Werten oberhalb des IP zurückdrängen. Im Fall von basischen Proteinen kann dieser Ansatz dazu führen, daß sehr hohe pH-Werte und somit stark denaturierende Bedingungen gewählt werden müssen. Daneben besteht die Gefahr, daß die Analyten hydrolysiert, deaminiert oder oxidiert werden.

Zu Beginn der 1990er Jahre wurden die ersten systematischen Experimente zur Wiederfindung von Proteinen bei unterschiedlichen pH-Werten von Towns und Regnier durchgeführt [4]. Bei den Untersuchungen, welche Auswirkungen die Adsorption der Analyten an der Kapillarwand hat, wurde ein CE-Gerät mit drei Detektoren verwendet. Der Einsatz eines solchen Systems erlaubt es, die Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Kapillarlänge zu ermitteln. Dabei konnte gezeigt werden, daß für die Adsorption ein eindeutiger Zusammenhang zwischen IP und pH-Wert besteht. Wäh-

rend bei pH 7,0 basische Proteine mit einem  $IP > 9$  vollständig adsorbieren, beträgt die Wiederfindungsrate bei sauren Analyten ( $IP < 4$ ) innerhalb eines Laufes über 90%. Außerdem konnte gezeigt werden, daß bei den untersuchten Proteinen die Wiederfindung stark vom pH-Wert abhängt.

Eine wichtige Erkenntnis aus diesen Versuchen ist, daß die Abnahme des EOF in axialer Richtung nicht uniform erfolgt. Allgemein äußert sich die Proteinadsorption durch die Verbreiterung der Peaks, durch Tailing und die Zunahme der Migrationszeiten. Damit sind auch Einbußen bei der Reproduzierbarkeit, der Trennleistung und der Wiederfindung der Analyten verbunden.

### 5.1.2 Ansätze zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit

Durch die frühen Vergleichsstudien ist deutlich geworden, daß es sehr schwierig ist, Methoden zu entwickeln, die den unterschiedlichen Anforderungen vieler Proteine gleichermaßen gerecht werden. In der Folgezeit hat man zahlreiche Methoden entwickelt, bei denen die Versuchsparameter auf einzelne Analyten bzw. kleine, mikroheterogene Proteingruppen optimiert wurden. Durch diese Maßnahmen konnten Präzision, Robustheit und Reproduzierbarkeit deutlich verbessert werden. Beispielsweise lassen sich lipophile, membranständige Vertreter durch den Zusatz von organischen Cosolvenzen analysieren. Man löst einerseits die Solubilisationsprobleme, andererseits kann durch die Änderung von Viskosität und  $\zeta$ -Potential die Trennleistung optimiert werden [98][99]. Andere Ansätze greifen die Überlegung auf, daß ionische Wechselwirkungen den größten Beitrag zur Adsorption der Proteine an der Kapillaroberfläche liefern. Um die wirkenden Anziehungskräfte zu reduzieren, können saure, isoelektrische Puffer [59][100] eingesetzt werden, die den Dissoziationsgrad der Silanol-Gruppen stark reduzieren. Die damit verbundene Reduktion des  $\zeta$ -Potentials läßt sich aber auch durch die Verwendung von kovalenten Beschichtungen [101] erreichen, wie sie auch in der CIEF verwendet werden (vgl. Kap. 3.3.3 und 4.3).

Eine weitere Möglichkeit dem Problem zu begegnen, besteht in der Verwendung von niedermolekularen Pufferadditiven wie Oligoaminen oder quartären Ammoniumverbindungen [49][51][102][103]. Durch die Adsorption der Modifier kommt es zu einer Verminderung des Grenzflächenpotentials bzw. zu einer Änderung des Potentialvorzeichens. Unter den gleichen, vormals kritischen Bedingungen wirken nur noch ver-

einzelte Coulomb-Kräfte, bzw. Protein und Kapillaroberfläche stoßen sich durch gleichnamige Ladungen ab (vgl. Kap. 3.3.2.2).

Neben den praktischen Ansätzen zeigen computerbasierte Verfahren ein anderes Hauptproblem auf. Bei der Simulation von Trennprozessen in der CZE, ITP und CIEF bereitet die molekulardynamische Emulation des Verhaltens von Biopolymeren immense Schwierigkeiten [89][104][105]. Neben der großen Anzahl von Freiheitsgraden beeinflussen viele andere Faktoren das Proteinverhalten. Aus diesem Grund lassen sich nur vage Prognosen für das Verhalten eines Analyten unter den Versuchsbedingungen stellen.

### **5.1.3 Zielstellung**

Um Verbesserungen bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung von Analyten erzielen zu können, ist es wichtig, zunächst die proteinimmanenten Einflußgrößen zu untersuchen. Im Fokus stehen dabei insbesondere die Molekülgröße, die Hydrophilie/-phobie (GRAVY-Score), die Tertiär-/Quartärstruktur und die konformative Stabilität des Proteins. Gerade die letztgenannte Eigenschaft ist für die physikalische Instabilität maßgebend. Diese spielt nicht nur bei der Lyophilisation eine wichtige Rolle [106][107], sondern ist vermutlich eines der Hauptprobleme, das an Grenzflächen wie der Kapillarwand auftreten kann [108].

#### **5.1.3.1 Der Elektroosmotische Fluß – eine zentrale Größe**

In zahlreichen praktischen und theoretischen Arbeiten ist der Einfluß von Veränderung der Oberflächen, z.B. durch die Adsorption von Analyten, auf das  $\zeta$ -Potential untersucht worden. Insbesondere im Bereich der Miniaturisierung von CE-Systemen (CE on a chip) ist der Einfluß des EOF auf die Reproduzierbarkeit sehr groß. Durch die geringen Abmessungen, vor allem wegen der geringen Kanalhöhe (Breite 20-100  $\mu\text{m}$ , Höhe 10-30  $\mu\text{m}$ ,  $l_{\text{ges}}$  1-5 cm) wird der Einfluß von Oberflächenpotentialen verstärkt. Durch die Abmessungen des Trennkompartmentes ist die Debye-Hückel-Länge mit 1-10 nm [109] im Vergleich zum Durchmesser nicht mehr vernachlässigbar klein und reicht deutlich weiter in die Elektrolytlösung hinein. Zusätzlich liegen die Pufferkonzentrationen niedriger, um die Stromstärken in den Systemen besser kontrollieren zu können. Daher treten leichter kleine Potentialschwankungen auf, welche die Reproduzierbarkeit deutlich verschlechtern. Diese anfänglichen Schwierigkeiten waren des-

halb auch der Anlaß dafür, daß die Anstrengungen im Bereich der Grundlagenforschung intensiviert wurden. In der Folge wurden die Modelle zur Beschreibung der oberflächennahen Prozesse deutlich verbessert. Zu den wichtigen Erkenntnissen gehört u. a., daß die Hintergrundelektrolyte (engl. **background electrolytes**, BGE) deutlich größeren Einfluß auf die Elektrophorese haben, als angenommen wurde. Neben den potentialbestimmenden Prozessen an der Grenzfläche beeinflussen die sich ausbildenden Konzentrationsgefälle während eines Laufes die Wiederholbarkeit in miniaturisierten CE-Systemen. Die Gradienten werden durch die unterschiedlichen Eigenmobilitäten der Pufferkomponenten verursacht. In Folge dessen liegt ein axial diskontinuierlicher EOF vor, der außerdem auch zeitabhängig ist und zu Peakasymmetrien führen kann [110][111]. Weiterhin wurde gezeigt, daß nicht nur die Ionenstärke selbst und die Wertigkeit der Elektrolyte für das Oberflächenpotential an der Kapillarwand maßgeblich sind. Auch die Art der Ionen selbst stellt eine Einflußgröße dar [92][112][113].

### 5.1.3.2 Systemimmanente Einflüsse

Normal dimensionierte CE-Systeme (vgl. Kap. 1.1.3) reagieren weniger empfindlich auf diese Methodenparameter. Dennoch tragen die Hintergrundelektrolyte und deren Eigenmobilitäten zur Streuung von Meßwerten bei, so daß ihr Einfluß als systemimmanente Größe bei der Methodenentwicklung berücksichtigt werden muß.

Ein weiterer Faktor, welcher die Präzision beeinflusst, ist die Hysteresis des EOF im pH-Bereich 5-7. Für die verzögerte Gleichgewichtseinstellung werden Quellungsprozesse der Glasoberfläche diskutiert, die nach einer alkalischen Konditionierung der Kapillare auftreten. Die ausgebildete Gelschicht behindert wahrscheinlich den Durchtritt von Kationen durch die elektrochemische Doppelschicht (EDL) [16]. Ein weiterer Aspekt ist die Effizienz des Kühlsystems eines CE-Gerätes. Im Verlauf einer Meßreihe kann sich der Puffer durch unzureichende Wärmeabführung zunehmend erwärmen und eine kritische Temperatur erreichen. Wird eine kritische Stromstärke überschritten, wird vermehrt Wärme freigesetzt. Dadurch, daß die Viskosität abnimmt, steigen sowohl Leitfähigkeit als auch Stromfluß. Beim Überschreiten eines kritischen Schwellenwertes beobachtet man eine sprunghafte Zunahme des Stromflusses, welche die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt.

### 5.1.3.3 Taylor-Aris-Dispersion

Bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung von Proteinen wird die Präzision der Methode durch die Adsorption von Proteinen an der Kapillaroberfläche beeinträchtigt. Zu den typischen Anzeichen für diesen Vorgang gehört insbesondere die Zunahme der Migrationszeiten. Diese beobachtet man häufig bei pH-Werten im Bereich um den IP des Proteins [59]. Die Adsorption reicht aber nicht aus, um die Beobachtungen zu erklären. Bereits die Untersuchungen von Towns und Regnier haben gezeigt [4], daß die elektroosmotische Mobilität durch die Adsorption von basischen Proteinen vermindert wird. Sie konnten allerdings auch zeigen, daß die Migrationsgeschwindigkeit von EOF-Markern nicht gleichmäßig abnimmt, sondern sich ein axialer Gradient von  $\mu_{\text{EOF}}$  ausbildet. In den Segmenten, welche die Proteine noch nicht erreicht haben, weisen die Analyten eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit auf. Deshalb muß neben der Verminderung des  $\zeta$ -Potentials auch die räumliche und zeitliche Auflösung der Abnahme berücksichtigt werden.

Durch die axiale Diffusion der Analyten verbreitert sich die Probenzone in Segmenten mit niedriger Migrationsgeschwindigkeit stärker als in den Bereichen, in denen keine Adsorption erfolgt ist. Allerdings tragen noch weitere Prozesse zur Verbreiterung der Probenzone bei [52][114]. Im Übergangsbereich von Segmenten mit Proteinablagerungen zu Zonen mit unveränderten Oberflächeneigenschaften treten zusätzliche Effekte auf, die durch das Taylor-Aris-Dispersionsmodell beschreiben werden.

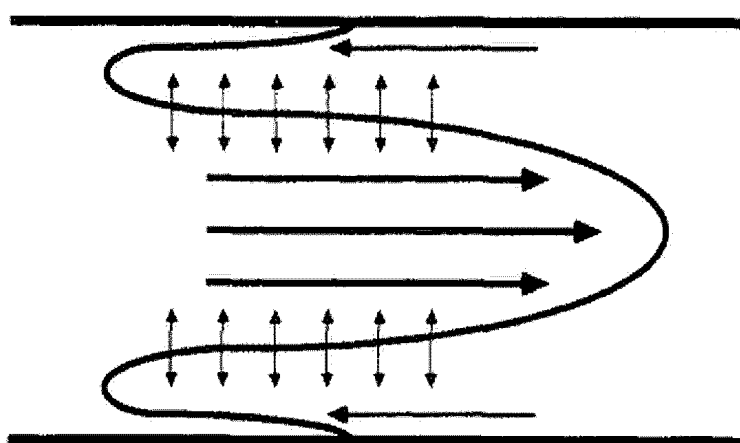


Abbildung 5.1: axiale und radiale Migrationsgeschwindigkeiten durch Analytadsorption aus [4]

In diesem Modell wird die fortlaufende räumliche und zeitliche Änderung des Strömungsfeldes berücksichtigt, welche sich auf die Geschwindigkeitsvektoren der Analytmoleküle auswirken [20][109] und zu einer ungleichmäßigen Beschleunigung der

Probenzonen führen. Um das Disperionsmodell besser verstehen zu können, zeigt Abb. 5.1 die elektroosmotischen Mobilitäten als axiale Vektoren. Die Zeichnung bezieht sich auf ein Segment, in dem sich Proteinplaques gebildet haben. In der Nähe der Kapillaroberfläche ist die Mobilität der Analyten herabgesetzt, oder der Wanderungsrichtung der restlichen Elektrolytlösung entgegengesetzt, sofern eine Potentialumkehr vorliegt. In den Arealen, in denen die Kieselglasoberfläche nicht verändert wurde, wird die Flüssigkeit durch den EOF (vgl. Abb. 1.9, S. 21) mobilisiert. Durch diesen Volumenstrom wird auch die Flüssigkeit in Bewegung versetzt, die in den Segmenten mit Proteinplaques weiter von der Oberfläche entfernt ist. Durch radiale Diffusion geraten Moleküle innerhalb dieses Segmentes in Bereiche mit unterschiedlicher, longitudinaler Geschwindigkeit. Diese Dispersion führt zur einer vom stempel-förmigen Profil abweichenden Geometrie der Probenzone.

### 5.2 CZE-Methode

Um die Ausbildung des  $\zeta$ -Potentials und des elektroosmotischen Flusses beschreiben zu können (vgl. Kap. 1.3 und 5.1), sind sehr detaillierte und komplexe Modelle entwickelt worden. In der Praxis führen schon kleine Schwankungen von Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke (vgl. Kap. 1.4) zu Problemen, z.B. bei der Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Peakflächen und beeinflussen die Präzision einer Methode maßgeblich. Dies betrifft die Analytik von Proteinen mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese im Besonderen. Die Robustheit einer Methode hängt davon ab, wie ausgeprägt die Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Kapillaroberfläche sind. Die Prozesse, die in der inneren Helmholtz-Schicht ablaufen, sind besonders kritisch für die Präzision.

Um die Glasoberfläche charakterisieren zu können, muß die Kapillare im allgemeinen geöffnet werden. Typischerweise wird dieser Schritt durchgeführt, um die Unterschiede vor und nach einer kovalenten Beschichtung oder die Bildung von Adsorbaten untersuchen zu können. Durch den Öffnungsprozeß können leicht Artefakte entstehen, welche die Interpretation der Ergebnisse erschweren [115]. Die Veränderung der Oberfläche läßt sich auch indirekt untersuchen, indem die Auswirkungen auf die Migrationszeiten und Peakflächen ausgewertet werden. Grundsätzlich führen systemimmanente Faktoren (Kap. 5.1.3.2) und Adsorptionsvorgänge (Kap. 5.1.3.3) zu einer Verschlechterung der Präzision. Beide Vorgänge laufen simultan ab, so daß eine Vari-



anzanalyse schwierig ist. Um dennoch systembedingte und proteinimmanente Streuungen unterscheiden zu können, wird eine Methode entwickelt. Sie gliedert sich in drei Abschnitte mit jeweils etwa 15-30 Wiederholexperimenten, die unabhängig voneinander ausgewertet werden. Abschließend werden die Resultate der einzelnen Phasen miteinander verglichen. Dadurch lassen sich die Varianzen, welche durch die Proteinadsorption verursacht werden, näherungsweise bestimmen.

### **5.2.1 Dreiphasige Methode zur Analytik von Proteinen**

Die Methode gliedert sich in drei aufeinander folgende Phasen. Zunächst wird die Systempräzision ermittelt, dann erst wird die Untersuchung des Proteins vorgenommen. Zum Schluß wird die Systempräzision erneut bestimmt. Daraus resultieren drei Datensätze, die unabhängig voneinander ausgewertet werden. Die Systempräzision wird mit Hilfe eines Testgemisches bestimmt. Um statistisch gesicherte Daten zu erhalten, werden 15 bis 30 Messungen durchgeführt. Anhand der erhobenen Meßwerte werden u.a. das arithmetische Mittel, die Wiederholstandardabweichung (repeatability) und die relative Standardabweichung (RSD%) der Migrationszeiten, Peakflächen und korrigierten Peakflächen bestimmt. Dabei handelt es sich um eine Vorgehensweise, wie sie bei der Methodvalidierung und der Qualifizierung von Geräten üblich ist [80][81][116]. Die erhaltenen Werte dienen als Bezugsgröße für die eigentliche Untersuchung. Im direkten Anschluß wird die kapillarelektrophoretische Untersuchung des Proteins unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Neben dem Analyten enthält die Probe auch die Substanzen, die zuvor bei der Gerätequalifizierung verwendet wurden. Man ermittelt die oben genannten statistischen Parameter auch für diesen Abschnitt der Meßreihe und zieht sie zur Beurteilung von kritischen Versuchsbedingungen heran. Im dritten Abschnitt wird die Systempräzision erneut mit dem gleichen Substanzgemisch wie zu Versuchsbeginn bestimmt. Um vergleichbare, statistisch gesicherte Daten zu erhalten, nimmt man erneut 30 Messungen vor.

Da sich die proteinhaltige Probe und das Testgemisch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Ionenstärke unterscheiden, können auch bei den Migrationszeiten geringfügige Unterschiede auftreten. Neben dem Protein selbst tragen auch die nicht genau bekannten Zusätze aus dem Lyophilisationsprozeß des Analyten dazu bei. In Abhängigkeit von den chemischen Eigenschaften dieser Zusätze kann es zu Verände-

rungen des  $\zeta$ -Potentials und der Migrationszeiten kommen. Sofern es sich dabei um reversible Vorgänge handelt, lassen sich derartige Einflüsse auf die Systempräzision daran erkennen, daß sich die Migrationszeiten im dritten Teil der Meßreihe asymptotisch den ursprünglichen Werten annähern.

### 5.2.2 Statistischer Ansatz

Die Idee, welche dem dreiphasigen Versuchsdesign zugrunde liegt, besteht zunächst darin, von wenigen Meßgrößen ausgehend, wie dem EOF und den Peakflächen bzw. korrigierten Peakflächen, Veränderungen im Meßsystem zu erfassen. Aus den Resultaten lassen sich anschließend Rückschlüsse auf die auslösenden Prozesse an der Kapillaroberfläche ziehen. Ausgehend von Ergebnissen der Systempräzision werden den ausgewählten Größen die qualitativen Attribute Konstanz, Abnahme und Zunahme zugeordnet. Wählt man lediglich zwei Kriterien aus, z.B. elektroosmotische Mobilität und korrigierte Peakflächen, lassen sich unabhängig voneinander für jede der Meßgrößen, durch Vergleichen der Ausgangswerte mit denen aus der Proteinuntersuchung und der abschließenden Systempräzision, 9 mögliche Entwicklungen konstruieren (Abb. 5.2). Durch Kombination der beiden Größen erhöht sich so die Anzahl der möglichen Kombinationen auf 27 Varianten. Ihnen können theoretische Modelle zugeordnet werden, welche die beobachteten Vorgänge erklären. Bezieht man noch zu-

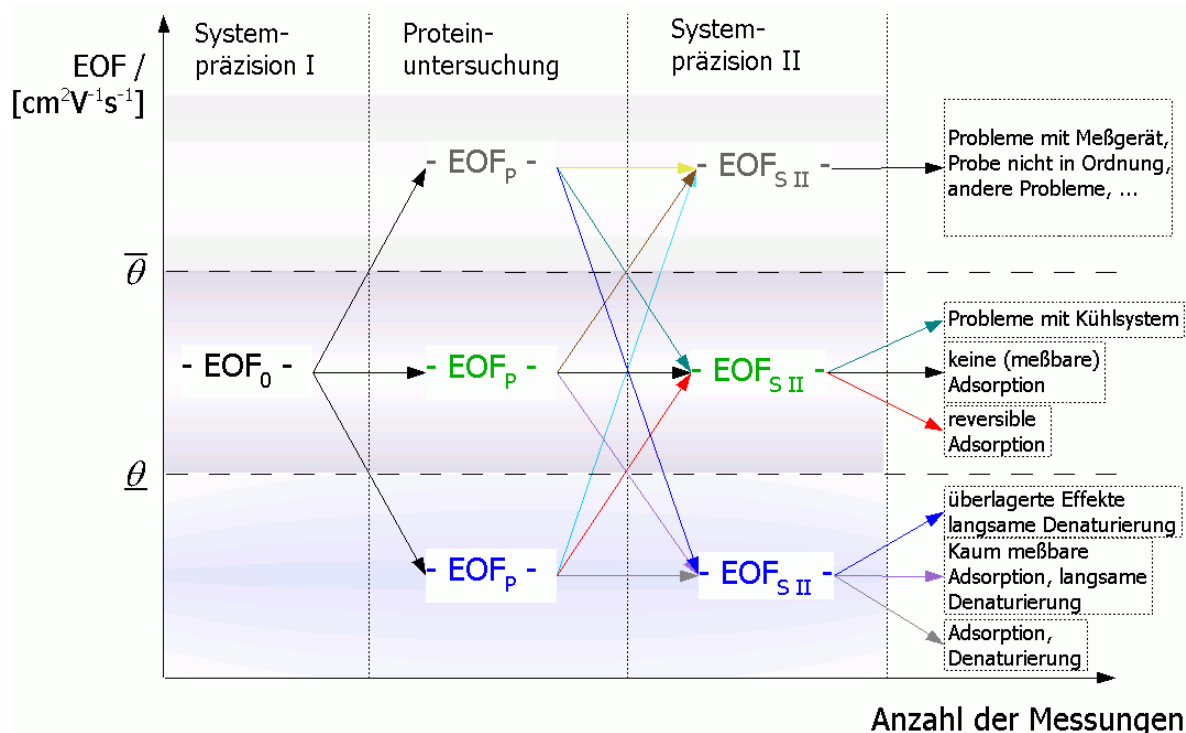


Abbildung 5.2: Diagramm der möglichen Verläufe des EOF innerhalb einer Meßserie

sätzlich vergleichende Zusatzmerkmale oder eine dritte Meßgröße in das Modell mit ein, läßt sich die Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten und damit die Zahl der denkbaren Prozesse noch deutlich erweitern. In Abb. 5.2 ist das entsprechende Schema für den EOF dargestellt. Aus der Abbildung läßt sich ableiten, welche Bedeutung die Festlegung der Grenzen  $\bar{\theta}$  und  $\underline{\theta}$  hat, anhand derer entschieden wird, ob eine Zunahme bzw. Abnahme des EOF vorliegt. Treten bei der Proteinuntersuchung im zweiten Teil der Meßserie deutliche Abweichungen, z.B. bei den Migrationszeiten, von den anfänglich ermittelten Werten auf, weist das bereits auf Adsorptionsvorgänge an der Kapillaroberfläche hin. Um Aussagen treffen zu können, ob es sich um reversible oder irreversible Prozesse handelt, müssen die Ergebnisse aus der abschließenden Bestimmung der Systempräzision abgewartet werden. Unterscheiden sich diese nicht signifikant von den Werten, die bei der Proteinuntersuchung erhalten wurden, liegt entweder eine irreversible Bindung an der Kieselglasoberfläche oder ein zumindest sehr langsam verlaufender Desorptionsprozeß vor. Wird die Adsorption des Proteins durch weniger ausgeprägte Anziehungskräfte vermittelt, erreichen die Migrationszeiten, unter geeigneten Versuchsbedingungen, die ursprünglichen Werte.

Eine Möglichkeit, die Grenzen festzulegen, besteht darin, statistische Prüfkriterien einzubeziehen. Um diesen Ansatz erfolgreich in die Praxis umsetzen zu können, bedarf es umfangreicher Meßreihen, um von gesicherten Werten ausgehen zu können. Unterstellt man, daß die Meßwerte bei der Bestimmung der Systempräzision zufällig streuen, so lassen sich mit zunehmender Anzahl  $n$  von Messungen die wahren Werte der Grundgesamtheit aus dem arithmetischen Mittel  $\bar{x}$ , der Standardabweichung  $\hat{\sigma}$  und der Varianz  $\hat{\sigma}^2$  besser abschätzen. Geht man von einem idealisierten Fall aus, bei dem keine Veränderungen an der Kapillaroberfläche auftreten, liegen bei der Proteinuntersuchung und bei der abschließenden Systempräzision ebenfalls normalverteilte Datensätze vor. Eine Prüfung auf Homoskedastizität der Datensätze läßt sich leicht mit Hilfe des F-Testes durchführen.

Meist werden die Varianzen der Meßgrößen zeitlich veränderlich sein, da Proteine als Analyten nur eine begrenzte Stabilität besitzen. Daher kann bestenfalls von heteroskedatischen Datensätzen ausgegangen werden, d.h., daß sich im Fall gleicher Mittelwerte unterschiedliche Standardabweichungen bzw. Varianzen beobachten lassen.

Bei den zu vergleichenden Mittelwerten handelt es sich um Schätzungen des jeweiligen arithmetischen Mittels. Zusätzlich muß festgelegt werden, wie groß die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  sein soll. Diese determiniert die Grenzen, zwischen denen der jeweils gesuchte wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von  $1-\alpha$  liegt. Um zu verhindern, daß die Intervallgrenzen  $\bar{\theta}$  und  $\underline{\theta}$  und sehr nah am arithmetischen Mittel liegen, werden für das zu prüfende statistische Modell nur Fehlerwahrscheinlichkeiten zwischen 5% berücksichtigt. Dadurch soll erreicht werden, daß geringfügige Unterschiede zwischen den Mittelwerten nicht als statistisch signifikant erkannt und somit keine falschen Zuordnungen der deskriptiven Modelle getroffen werden.

### 5.2.3 Auswahl der Testsubstanzen

Zur Bestimmung der Systempräzision wird ein Substanzgemisch verwendet, das aus einem EOF-Marker und einem internen Standard besteht. Da Acetanilid als elektrisch neutral reagierende Substanz die notwendigen Anforderungen an EOF-Marker erfüllt (vgl. Kapitel 1.4.5.2), läßt sich aus den Migrationszeiten der Substanz die elektroosmotische Mobilität direkt berechnen.

Prinzipiell lassen sich sowohl anionische als auch kationische Substanzen als interner Standard verwenden. Neben verschiedenen Auswahlkriterien, wie einem großen Absorptionskoeffizienten bei der verwendeten Wellenlänge und ausreichender chemischer Stabilität, sollte der interne Standard eine ähnliche elektrophoretische Mobilität besitzen wie der zu bestimmende Analyt. Dies ist deshalb hervorzuheben, weil durch vergleichbare Migrationsgeschwindigkeiten der Einfluß von EOF-Schwankungen auf die Peakflächen minimiert werden kann (vgl. Kap 1.4.1.2).

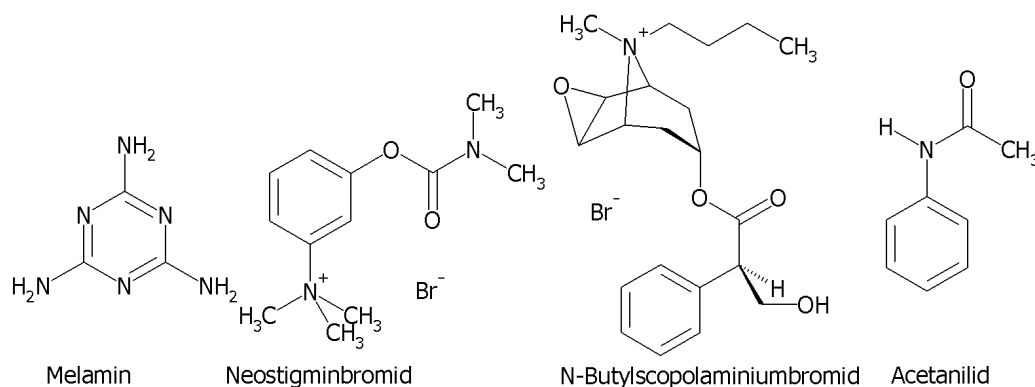


Abbildung 5.3: Strukturformeln der verwendeten Markersubstanzen

Im konkreten Fall ist diese Anforderung nicht praktikabel, da sich die Mobilitäten der zu untersuchten Proteine abhängig vom pH-Wert verändern und auch untereinander

unterscheiden. Folglich müßte für jede Versuchsreihe jeweils ein passender interner Standard gefunden werden. Um jedoch die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen besser miteinander vergleichen zu können, beschränkt sich die Auswahl auf wenige Substanzen: Melamin (2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin), Neostigminbromid und N-Butylscopolaminiumbromid. Auf die Verwendung von anionischen Substanzen als internem Standard wird aus zwei Gründen verzichtet.

- Der größte Teil der Untersuchungen erfolgt bei pH-Werten, bei denen die Proteine negativ geladen vorliegen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Mobilität des Proteins innerhalb der Meßserie verändert. Daher besteht die Gefahr, daß es trotz sorgfältiger Auswahl des internen Standards zur Überschneidung von Peaks kommt. Um daraus erwachsende Integrationsprobleme zu vermeiden, werden entweder elektrisch neutrale oder positiv geladene Substanzen verwendet.
- Bei Untersuchungen, die bei pH-Werten in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins durchgeführt werden, kann es durch die zunehmende Adsorption des Makromoleküls zu schwerwiegenden Problemen kommen. Neben einer deutlichen Zunahme der Migrationszeiten kann es zur Inversion des  $\zeta$ -Potentials kommen.

Unter diesen Bedingungen lassen sich die Analyten nur dadurch zum Detektionsfenster transportieren, indem zusätzlich zur Spannung Druck angelegt wird oder die Elektroden innerhalb der Meßserie umgepolt werden. Die Verwendung eines kationischen internen Standards mit ausreichend hoher elektrophoretischer Mobilität hat unter kritischen Bedingungen den Vorteil, daß sich unabhängig vom Ausmaß der EOF-Veränderung mindestens ein Substanzpeak beobachten läßt.

#### **5.2.4 Puffersysteme**

Die isoelektrischen Punkte der untersuchten Proteine liegen im Bereich von pH 4,81 ( $\beta$ -Lactoglobulin) bis pH 9,59 (Cytochrom C). Bei den Werten handelt es sich um numerisch berechnete Größen, die allein auf der Aminosäurefrequenz des Proteins beruhen (<http://www.expasy.org/sprot/>) [117] und nicht experimentell bestimmt wurden. Im Fall von  $\beta$ -Lactoglobulin belegen Untersuchungen, daß der IP bei  $\sim 5,2$  liegt (vgl. Kap. 5.5). Um das Adsorptionsverhalten der Proteine zu studieren, wurden ver-

schiedene Puffersysteme verwendet, die das Spektrum von pH 5,0 bis 11,5 abdecken (Tab. 1). Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Puffer findet sich in den Tabellen 7.4.1 bis 7.4.3. Die basischen Puffersysteme bei pH 10,5, 11,0 und 11,5 wurden ausschließlich bei Cytochrom C verwendet. Bei den übrigen Proteinen beschränken sich die Versuche auf das Intervall von pH 5,0 bis 9,2.

Puffer	pH-Wert	Konzentration
Essigsäure/ Natriumacetat	pH 5,00	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 5,00	100 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 5,25	100 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 5,50	50 mmol·l <sup>-1</sup>
Phosphat	pH 6,00	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 6,50	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 7,00	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 8,00	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 9,20	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 11,00	50 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 11,50	50 mmol·l <sup>-1</sup>
Borsäure/ Natriumtetraborat	pH 8,40	120 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 9,20	100 mmol·l <sup>-1</sup>
	pH 10,50	100 mmol·l <sup>-1</sup>

Tabelle 5.2.4.1: verwendete Puffersysteme (vgl. Kap. 7)

Die Puffersysteme werden hinsichtlich ihrer Eigenschaften, wie der Ionenstärke, so gewählt, daß sie den Anforderungen der geplanten Untersuchungen gerecht werden.

Die wichtigsten Kriterien sind:

- spektroskopische Eigenschaften
- Wechselwirkungen mit dem Protein
- spezifische Leitfähigkeit
- Pufferkapazität
- Art und Konzentration der Kationen.

### 5.2.4.1 Gerätebedingte Faktoren

Die verwendeten Puffersysteme stellen einen Kompromiß zwischen gerätebedingten Vorgaben und proteinimmanenten Anforderungen dar. Das Crystal CE 310 System weist die konstruktionsbedingte Besonderheit auf, daß das Auslaßgefäß (ca. 40 ml) im laufenden Betrieb weder gewechselt noch dessen Inhalt getauscht werden kann. Daher muß der Puffer eine ausreichend hohe Kapazität besitzen, damit sich im Verlauf der Meßserie keine pH-Gradienten ausbilden können.

Die Detektion der Proteine erfolgt im kurzwelligen Bereich bei  $\lambda = 210$  nm und beruht auf der Absorption durch die Peptidbindungen der Aminosäurekette. Dieses auch als Backbone bezeichnete Chromophor ist bei allen Proteinen vorhanden.

Sowohl die Nachweis- als auch die Bestimmungsgrenze wird durch die Elektrolytkonzentrationen beeinflusst. Daher werden einfache, anorganische Puffersysteme mit geringer Eigenabsorption eingesetzt. Außerdem haben diese den Vorteil, daß ihr Einfluß auf das  $\zeta$ -Potential gut erforscht ist. Durch die vergleichsweise hohe spezifische Leitfähigkeit muß bei der Methodenentwicklung auf Wärmeentwicklung geachtet werden. Darüber hinaus beeinflussen die Pufferionen auch die Proteinstruktur. In Kap. 5.4.2.4 wird insbesondere auf den Einfluß von Phosphaten genauer eingegangen werden.

#### **5.2.4.2 Proteinimmanente Faktoren**

Neben diesen allgemeinen Aspekten müssen auch die proteinspezifischen Faktoren berücksichtigt werden. Dies betrifft vor allem den Einfluß der Puffersubstanzen auf die konformative Stabilität des Analyten. In der Hofmeister-Serie sind Ionen gemäß ihrer Ladungsdichte respektive Polarisierbarkeit in eine Reihenfolge gebracht worden. Mit steigender Ladungsdichte nimmt die Fähigkeit ab, Wassercluster aufzubrechen, Proteinassoziate aufzulösen und die Viskosität der Lösung herabzusetzen (taxigener Effekt). Anhand der Hofmeister-Serie kann bereits abgeschätzt werden, ob die Pufferelektrolyte die Sekundär-/Tertiärstruktur stabilisieren können. Gleichzeitig besteht die Gefahr, daß die Makromoleküle ausgesalzt werden [3][118]. Der Einfluß von Elektrolyten ist unter anderem in molekulardynamischen Studien untersucht worden, die mittels der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC) durchgeführt wurden [119][120]. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Sekundär- und Tertiärstruktur sowohl unter thermischen als auch chemischen Streßbedingungen weniger stark verändert wird, wenn die mobile Phase stabilisierende Salze enthält. Gleichzeitig belegt aber eine andere Studie, daß die Adsorptionsisothermen von Proteinen zwar durch Pufferelektrolyte beeinflusst werden, diese Salze aber keinen Effekt auf das Desorptionsverhalten haben. Eine teilweise Desorption läßt sich hingegen schon durch Spülen mit NaCl-haltiger Lösung erreichen [121].

Im Vergleich zu den RP-HPLC-Methoden und sorptionsisothermischen Untersuchungen sind die Möglichkeiten in der CE begrenzt, die Stabilität der Proteinstruktur durch ionische Zusätze zu beeinflussen. Neben der Hintergrundabsorption nehmen auch

Stromstärke und Joulesche Wärme durch die erhöhte Ionenstärke zu, was wiederum die Proteininstabilität negativ beeinflusst. Deshalb ergibt sich die Fragestellung, ob diese Ansätze in der CE erfolgreich umgesetzt werden können. Weiterhin soll geklärt werden, ob sich die Ladungen der Proteinmoleküle und der Kapillaroberfläche durch geeignete Pufferelektrolyte ausreichend abschirmen lassen, um unerwünschte Adsorptionsprozesse zurückzudrängen.

### 5.2.5 Herstellung der Puffer und Lösungen

Die Herstellung der Puffer erfolgt nach einem festgelegten Schema. Die für die Herstellung benötigten Substanzmengen werden mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gl. 25) berechnet, eingewogen und mit bidestilliertem Wasser auf das endgültige Volumen aufgefüllt (vgl. Kap. 7.4).

$$\text{pH} = \text{pK}_s - \lg \frac{c(\text{S})}{c(\text{B})} \quad (\text{Gl. 25})$$

pH: negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen Aktivität

pK<sub>s</sub>: negativ dekadischer Logarithmus der Säuredissoziationskonstanten

c(S): Konzentration der schwachen Säure

c(B): Konzentration der korrespondierenden Base

Zur Herstellung der Stammlösung von Neostigmin bzw. Melamin und Acetanilid werden die Substanzen eingewogen und im frisch hergestellten Puffer gelöst. Das Protein wird in isotonischer Kochsalzlösung solvatisiert. Alle Lösungen sowie der Puffer werden durch einen Celluloseacetat/-nitrat Spritzenfilter mit 220 nm Porenweite steril filtriert. Die Probenlösung wird durch Mischen der Proteinlösung mit Puffer und Stammlösung hergestellt, während die Vergleichslösung anstelle der Proteinlösung das gleiche Volumen an isotonischer Kochsalzlösung enthält. Alle Lösungen werden frisch hergestellt und mit Ausnahme der proteinhaltigen Probe vor Gebrauch im Ultraschallbad entgast.

In den Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 ist bereits auf die Zielsetzungen und die statistischen Aspekte des dreiphasigen Versuchsaufbaus eingegangen worden. Dabei kommt der einleitenden Bestimmung der Systempräzision große Bedeutung zu. Anhand der hier ermittelten Werte werden die Grenzen und festgelegt. Um die Streuung der Meßwerte innerhalb dieses Datensatzes gering zu halten, wurde von der sonst üblichen Praxis abgewichen. Während die Pufferlösung, die man für die elektrophoretische Trennung verwendet, sonst alle 5 bis 10 Läufe gewechselt wird, kann bei den Unicam



Crystal CE 310 Systemen darauf verzichtet werden. Die Pufferkonzentration liegt mit 50-120 mmol·l<sup>-1</sup> vergleichsweise hoch. Zusätzlich ist das Gefäßvolumen mit 4 ml deutlich größer als bei den Modellen anderer Hersteller. Daher können die Folgen der elektrochemischen Umsetzungen auf den pH-Wert vernachlässigt werden.

Zu Beginn eines jeden Abschnitts einer Meßserie wird ein neues Einlaßgefäß mit frischer Pufferlösung für die elektrophoretische Trennung verwendet. Zusätzlich wird die Kapillare vor jedem Lauf mit Puffer aus einem separaten Gefäß gespült. Das komplette Volumen der Kapillare wird dabei mehrfach gewechselt. Dadurch wird verhindert, daß sich ein pH-Wert-Gradient zwischen beiden Lösungen ausbildet.

### 5.3 Cytochrom C – ein basisches Globulin

Zu den untersuchten Proteinen gehört Cytochrom C, das aus dem Myokard des Pferdes (*Equus caballus*) stammt. Zu den Besonderheiten dieses basischen, globulären Enzyms aus der mitochondrialen Atmungskette [122] gehört, daß das Protoporphyrin IX-Ringsystem kovalent über die Seitenketten von Cys<sup>14</sup> und Cys<sup>17</sup> gebunden vorliegt und daß die Proteinstruktur durch Koordination des Eisenions über His<sup>18</sup> und Met<sup>80</sup> stabilisiert wird. Die Primärstruktur des monomer vorliegenden Proteins umfaßt 104 Aminosäuren, und die Molekularmasse liegt bei 12 kDa. Die Werte für den IP werden in der Literatur mit 10,0 [123] bzw. 10,6 [124] angegeben. Diese weichen vom theoretischen Wert von 9,59 ab, der sich durch die Anwendung von mathematischen Algorithmen [117] auf die Aminosäuresequenz ergibt. Zu den weiteren Informationen, die in der „ExPASy Proteomics Server“ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics hinterlegt sind, gehört auch, daß Cytochrom C außer einer Acetylierung des N-terminalen Endes keiner weiteren posttranslationalen Modifikation unterliegt.

Cytochrom C wurde aus verschiedenen Gründen für die Untersuchungen ausgewählt, wobei neben den physikochemischen Eigenschaften und der Verfügbarkeit auch das Vorliegen von molekulardynamischen Untersuchungen ausschlaggebend gewesen ist. Das primäre Ziel der Untersuchungen ist es, das Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert zu studieren. Zusätzlich soll geklärt werden, ob das relativ niedrige Molekulargewicht von Cytochrom C, verglichen mit den anderen Modellproteinen, die Adsorption beeinflusst und andere Faktoren eine Rolle spielen. Die Versuchsreihen umfassen deshalb Puffersysteme im Bereich von pH 7,0 bis 11,5. Detaillierte Angaben zu den Meßreihen finden sich Kapitel 9.2.

#### 5.3.1 Untersuchungen bei pH 7,0

Die Ausgangsbedingungen für die kapillarzonenelektrophoretische Untersuchung von Cytochrom C sind bei pH 7,0 prinzipiell als kritisch einzustufen. Während das Protein in kationischer Form vorliegt, ist die Kieselglasoberfläche negativ geladen, so daß mit ausgeprägten Wechselwirkungen gerechnet werden muß. Als Trennmedium wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet, in dem die Vergleichssubstanzen Melamin und Acetanild gelöst werden. Die Ergebnisse der Systempräzision sind in Tabelle 5.3.1.1 zusammengefaßt.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Melamin	2,332	2,316	2,349	0,032	1,385	0,00104
Fläche	[AU·min]	Melamin	200,776	199,445	202,106	2,629	1,309	6,91151
kor. Fläche	[AU]	Melamin	86,109	85,130	87,087	1,934	2,246	3,73946
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	8,234	8,177	8,291	0,113	1,377	0,01286

Tabelle 5.3.1.1: Ergebnisse Systempräzision (CYTO-170703)

Innerhalb der Meßserie mit Cytochrom C verändert sich das Migrationsverhalten fortlaufend. Die in Abb. 5.4 zusammengefaßten Elektropherogramme zeigen nicht nur exemplarisch die starke Zunahme der Migrationszeiten, sondern auch die deutliche Veränderung des Peakmusters. Während im ersten Elektropherogramm lediglich das Signal (1) der komigrierenden EOF-Marker zu erkennen ist, läßt sich das Protein (2) erst nach einigen Läufen in Form von mehreren Peaks beobachten. Im Verlauf der Meßreihe wird dieses Muster zunehmend komplexer. Die Auswertung wird außerdem dadurch erschwert, daß die Migrationszeiten stark schwanken und die Meßsignale sich teilweise außerhalb des Zeitfensters der Datenaufnahme bewegen. Während sich in den Läufen 15 und 16 die Signale wegen des Fehlens des EOF-Marker-Peaks nicht zuordnen lassen, zeigen die UV-Spuren der Läufe 12-14, 17-25 und 28-30 nur unterschiedlich stark ausgeprägte Schwankungen der Basislinie.

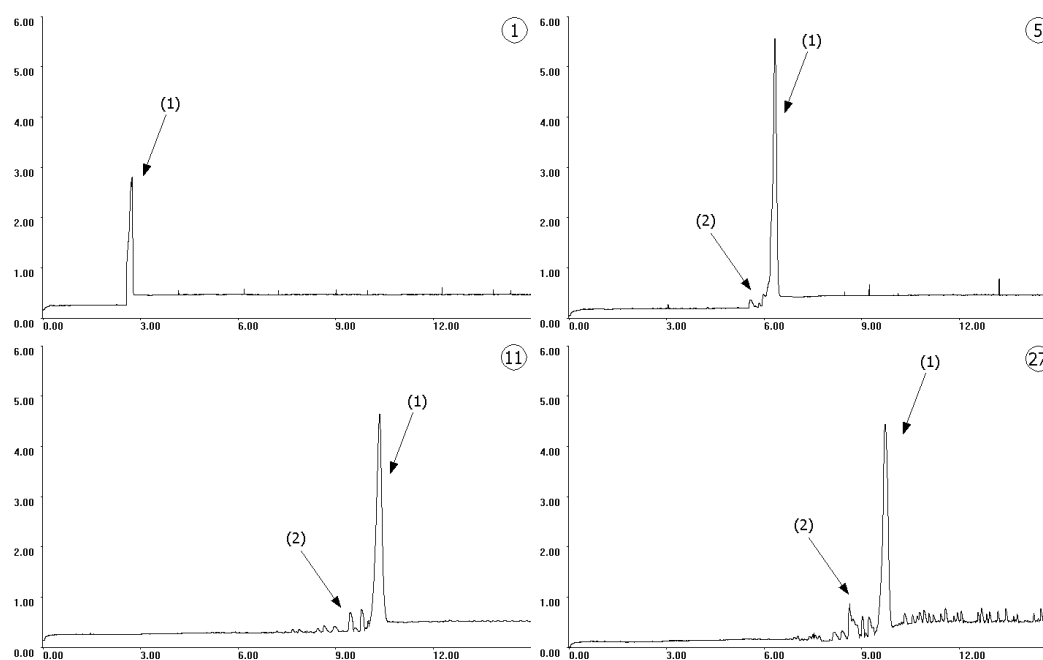


Abbildung 5.4: Cytochrom C ( $\sim 14$  ng pro Injektion)  
 Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 104 \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 01, 05, 11, 27  
 (1) Melamin/Acetanilid, (2) Cytochrom C

Die Abnahme des EOF führt nicht nur zu einer Zunahme der Migrationszeiten, sondern auch dazu, daß die Trennleistung bei Analyten mit ähnlichen elektrophoretischen Mobilitäten, z.B. Isoformen eines Proteins, verbessert wird (Gl. 26).

$$R = \frac{\bar{x}}{4\sigma} \cdot \frac{\Delta v}{\bar{v}} = 0,177 \cdot (\mu_1 - \mu_2) \cdot \sqrt{\frac{U}{D \cdot (\bar{\mu} + \mu_{\text{EOF}})}} \quad (\text{Gl. 26})$$

R: Auflösung

$\bar{x}$ : mittlere Migrationszeit von zwei Analyten

$\sigma$ : mittlere Standardabweichung der Migrationszeiten beider Substanzpeaks

$\Delta v$ : Differenz der Migrationsgeschwindigkeiten zweier Analyten

$\bar{v}$ : mittlere Migrationsgeschwindigkeiten von zwei Analyten

$\mu_1, \mu_2$ : elektrophoretische Mobilität der Analyten [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

U: Spannung [V]

D: Diffusionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$\bar{\mu}$ : mittlere elektrophoretische Mobilität der Analyten [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$\mu_{\text{EOF}}$ : elektroosmotische Mobilität [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

Allerdings muß auch berücksichtigt werden, daß die Veränderung des Peakmusters auch durch die Adsorption an der Kapillaroberfläche beeinflußt wird.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß unter den Versuchsbedingungen Cytochrom C sehr stark an der Kieselglasoberfläche adsorbiert. Die Wechselwirkungen lassen sich einerseits durch das Fehlen von Proteinpeaks in den ersten Läufen belegen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	8,701	6,294	11,107	4,755	54,651	22,61096
Fläche [AU·min]	Melamin	483,347	409,616	557,078	145,696	30,143	21227,3750
korr. Fläche [AU]	Melamin	67,883	55,360	80,407	24,747	36,455	612,41400
EOF [ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Melamin	2,880	2,053	3,706	1,633	56,709	2,66653

Tabelle 5.3.1.2: Cytochrom C pH 7,0, Ergebnisse EOF-Marker (CYTO-170703)

Andererseits sinkt die elektroosmotische Mobilität innerhalb weniger Läufe von  $8,28 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (letzter Kontrolllauf vor der Proteinuntersuchung) auf  $3,03 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Lauf 5) und fällt in Lauf 12 auf unter  $9,6 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ab. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung des EOF-Markers sind in Tab. 5.3.1.2 zusammengefaßt. Die Systempräzision konnte abschließend nicht bestimmt werden, da bei allen Läufen innerhalb der Meßzeit keine Peaks registriert werden konnten.

### 5.3.2 Untersuchungen bei pH 8,4

Bei den Untersuchungen kommt ein 120 mM Borat-Puffer, pH 8,4, zum Einsatz. Da Cytochrom C auch bei diesem pH-Wert positiv geladen vorliegt, muß bei der Verwendung eines kationischen internen Standards mit Peaküberlagerungen gerechnet werden. Um diesem Problem vorzubeugen, wird ein Gemisch aus Melamin und Acetanilid verwendet, das als EOF-Marker und Vergleichssubstanz dient. Aufgrund der bei pH 7,0 gewonnenen Ergebnisse wird die Analysenzeit von 20 auf 60 min verlängert. Während Cytochrom C in isotonischer Kochsalz-Lösung solvatisiert wird, löst man die

Vergleichssubstanzen direkt im Puffer. Die Ergebnisse der Systempräzision sind in Tab. 5.3.2.1 zusammengefaßt.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Melamin	2,094	2,087	2,102	0,015	0,701	0,00022
Fläche	[AU·min]	Melamin	215,011	213,486	216,536	3,013	1,402	9,08057
korr. Fläche	[AU]	Melamin	102,656	102,125	103,188	1,050	1,023	1,102
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	9,168	9,135	9,200	0,064	0,700	0,00411

Tabelle 5.3.2.1: Ergebnisse Systempräzision pH 8,4 (CYTO-090703)

Zu Beginn der Meßserie zeigt sich ein ähnliches Phänomen wie bei pH 7,0. Die Migrationszeiten des EOF-Markers (1) nehmen von 2,1 min während der Kontrollversuche deutlich bis zum Auftreten der ersten Cytochrom C Peaks (ca. 9 min, Lauf 5) zu. Im Gegensatz zu den Versuchen bei pH 7,0 verändert sich das Peakmuster während der Meßserie nicht so deutlich. Hervorzuheben ist, daß das Protein zwei separate Peaks liefert. Während die Migrationsgeschwindigkeit der basischen Isoform (3) nur wenig streut, verhält sich die zweite Fraktion (2) anders. Deren Migrationszeiten hängen deutlich stärker von der elektroosmotischen Mobilität des Systems ab. Da der Peak mit dem Signal des internen Standards überlappt, kann angenommen werden, daß diese Cytochrom C Fraktion einen kleineren IP aufweist. Um ausschließen zu können, daß es sich bei den überlappenden Signalen um Melamin und Acetanilid handelt, wird nach 20 Läufen erneut die Systempräzision bestimmt. Die dabei resultierende Peakform unterscheidet sich grundsätzlich von dem Signal, das bei der Proteinuntersuchung beobachtet wird.

Eine weitere Beobachtung, die auch bei pH 7,0 gemacht wird, ist die Zunahme des EOF nach 7 bis 10 Läufen. Diese ist allerdings nur schwach und nähert sich einem konstanten Wert von  $7,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  an. Zum Vergleich beträgt die elektroosmotische Mobilität bei der Systempräzision  $9,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Diese deutlichen Schwankungen schlagen sich auch in den Ergebnissen für Melamin nieder (Tab. 5.3.2.2). Im Verlauf der zweiten Serie mit Kontrollmessungen nimmt die Migrationszeit der EOF-Marker kontinuierlich um insgesamt 3 min ab. Berücksichtigt man aber, daß die elektroosmotische Mobilität mit ca.  $1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  sehr gering ist (vgl. Tab. 5.3.2.3), läßt sich die Zunahme um 21,2% durch äußere Einflüsse, wie z.B. Temperaturänderungen, erklären. Die absolute Änderung des EOF ist mit  $2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  etwa genauso groß wie die Schwankungen bei der einleitenden Bestimmungen der Systempräzision.

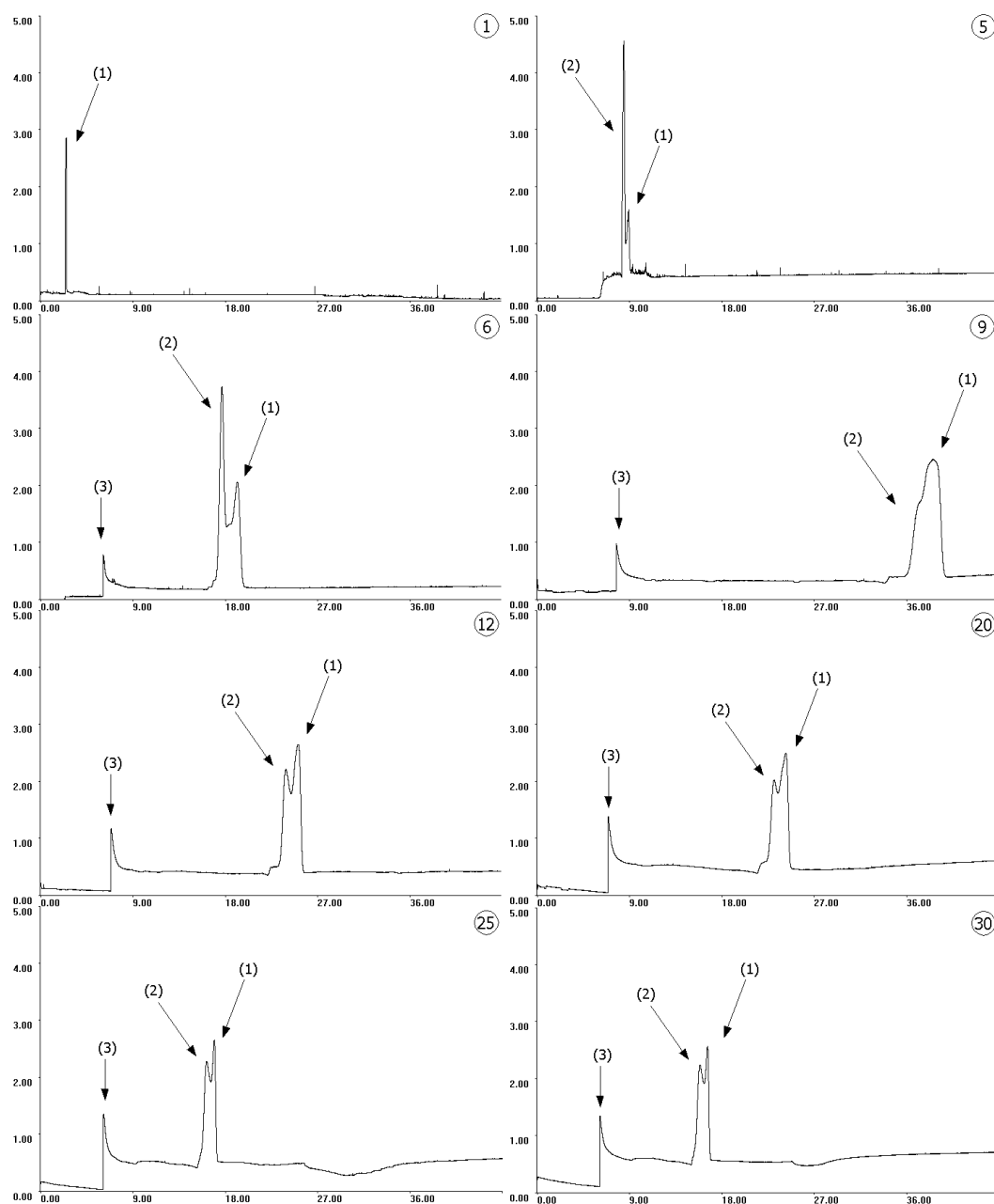


Abbildung 5.5: Cytochrom C ( $\sim 14\text{ ng}$  pro Injektion; CYTO-090703)  
 Borat-Puffer pH 8,4,  $120\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=25\text{ kV}$ ,  $I \sim 34\text{ }\mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 6, 9, 12, 20, 25, 30  
 (1) Melamin/Acetanilid, (2) und (3) Cytochrom C

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	23,122	17,716	28,527	12,022	51,994	144,52501
Fläche [ $\text{AU}\cdot\text{min}$ ]	Melamin	1138,570	609,474	1667,666	1176,693	103,348	1384607
korr. Fläche [AU]	Melamin	54,076	39,128	69,025	33,245	61,477	1105,208
EOF [ $10^{-4}\text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	1,729	0,757	2,700	2,161	125,045	4,67180

Tabelle 5.3.2.2: Experiment 1-20, pH 8,4 (CYTO-090703)

Im Anschluß an diese Bestimmung der Systempräzision wird eine zweite, 10 Läufe umfassende Meßreihe mit Cytochrom C durchgeführt. Deren Ziel ist es zu untersuchen, ob die Zunahme der scheinbaren elektrophoretischen Mobilität durch die Anwesenheit des Proteins beeinflusst wird.

Systempräzision 2 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Melamin	18,315	17,789	18,842	1,040	5,680	1,08212
Fläche	[AU·min]	Melamin	1726,641	1680,543	1772,739	91,093	5,276	8297,882
korr. Fläche	[AU]	Melamin	94,296	93,902	94,691	0,779	0,827	0,60751
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Melamin	1,052	1,020	1,083	0,062	5,922	0,00388

Tabelle 5.3.2.3: Ergebnisse der 2. Kontrollserie (CYTO-090703)

Das Peakmuster ist in allen Läufen gleich (vgl. Abb. 5.5, Läufe 25 und 30) und stimmt mit demjenigen überein, das auch in den letzten Elektropherogrammen des ersten Abschnittes der Meßreihe erhalten wurde. Außerdem nimmt der EOF weiterhin stetig zu, wobei die Migrationszeiten im gleichen Maß streuen wie bei den vorausgegangenen Kontrollversuchen (vgl. Tab. 5.3.2.4).

Experiment 21-30 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Melamin	17,394	16,878	17,910	0,833	4,789	0,69375
Fläche	[AU·min]	Melamin	314,177	276,658	351,695	60,534	19,267	3664,343
korr. Fläche	[AU]	Melamin	17,956	16,334	19,577	2,617	14,573	6,84657
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Melamin	1,106	1,074	1,138	0,052	4,679	0,00268

Tabelle 5.3.2.4: Ergebnisse 2. Cytochrom C Serie (CYTO-090703)

Dieser Trend setzt sich auch bei den abschließenden Kontrollexperimenten weiter fort, wobei sich die Migrationszeiten von Melamin und Acetanilid bei etwa 14,2 min einpendeln und der EOF einen konstanten Wert von  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  erreicht.

Experiment 1-30 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Cytochrom C 1	5,644	5,563	5,725	0,131	2,315	0,01707
Fläche	[AU·min]	Cytochrom C 1	1385,008	1344,878	1425,138	64,748	4,675	4192,3
korr. Fläche	[AU]	Cytochrom C 1	245,392	239,480	251,304	9,538	3,887	91,0
t <sub>Mig</sub>	[min]	Cytochrom C 2	23,869	22,325	25,412	2,728	11,429	7,4
Fläche	[AU·min]	Cytochrom C 2	261,314	135,932	386,696	221,604	84,804	49108,2
korr. Fläche	[AU]	Cytochrom C 2	11,984	4,606	19,362	13,040	108,813	170,0

Tabelle 5.3.2.5: Gesamtergebnisse Cytochrom C pH 8,4 (CYTO-090703)

Die Ergebnisse für beide Isoformen des Proteins sind in Tab. 5.3.2.5 zusammengefaßt. Eine verlässliche Analytik ist auch bei pH 8,4 nicht möglich. Vielmehr weisen die Ergebnisse darauf hin, daß es auch bei diesem pH-Wert zu massiven Problemen durch Adsorptionsprozesse kommt und daher andere Bedingungen gewählt werden müssen.

### 5.3.3 Untersuchungen bei pH 9,2

Für die Versuche wird ein 100 mM Borat-Puffer, pH 9,2, verwendet. Auch bei diesen Bedingungen liegt der theoretische IP von Cytochrom C über dem pH-Wert. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprechen denen der Meßserie bei pH 8,4. Diese Un-

tersuchungsreihe soll darüber Aufschluß geben, ob bei einem pH-Wert von 9,2 die Isoform des Cytochrom C mit dem niedrigeren IP anionisch geladen vorliegt und deshalb langsamer migriert als das verwendete EOF-Markergemisch aus Melamin und Acetanilid. Sollte diese Annahme zutreffen, müßte in den Elektropherogrammen das Signal der Bezugssubstanzen (1) zwischen den Peaks der Isoformen liegen.

Auch bei dieser Meßreihe wird zunächst die Systempräzision bestimmt, deren Ergebnisse in Tab. 5.3.3.1 zusammengefaßt sind. Während die RSD% für den EOF und die Migrationszeiten erwartungsgemäß unter 1% liegen, begründen sich die Schwankungen der Peakflächen auf einen Injektionsfehler zu Beginn der Meßreihe.

Systempräzision		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Melamin	2,809	2,796	2,822	0,026	0,924	0,00067
Fläche	[AU·min]	Melamin	284,710	278,923	290,496	11,435	4,016	130,76080
korr. Fläche	[AU]	Melamin	101,352	99,621	103,083	3,421	3,375	11,70326
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Melamin	6,837	6,805	6,868	0,063	0,918	0,00393

Tabelle 5.3.3.1: Ergebnisse Systempräzision Cytochrom C, pH 9,2 (CYTO-290603)

Wie bei den vorherigen Untersuchungen läßt sich das Protein in den ersten beiden Läufen nicht detektieren (Abb. 5.6, Lauf 1). Allerdings verändert sich das Peakmuster bereits ab dem 3. Elektropherogramm durch das Auftreten eines weiteren Signals (2). Die zugehörige Substanz weist eine geringere effektive Mobilität auf als die EOF-Marker. Deren Migrationsgeschwindigkeit verändert sich ab dem 4. bis zum 23. Lauf der Meßreihe jedoch nicht mehr nennenswert. Die Peakform des schneller migrierenden Proteinpeaks (2) verändert sich innerhalb von wenigen Läufen (4-6). Der Analyt erscheint ab der 8. Messung sogar vor den EOF-Markern. In den Läufen 7-10 läßt sich ein weiterer Peak (3) registrieren, wobei die anderen Probenzonen im Vergleich deutlich schneller migrieren. Ab dem 10. Lauf zeigen die Elektropherogramme dann ein vergleichbares Peakmuster. Der EOF läßt geringfügig nach. Daher ist es besonders auffällig, daß die Migrationszeiten des Proteinpeaks (2) gleichzeitig abnehmen (Läufe 12 und 24 in Abb. 5.6).

In den Elektropherogrammen 25-30 kommt es zu deutlichen Veränderungen. Obwohl Spannung und Stromstärke konstant bleiben, lassen sich keine Peaks mehr beobachten. Auch in den nachfolgenden Experimenten bleibt das Problem bestehen, so daß von einer abrupten Änderung des EOF ausgegangen werden muß.



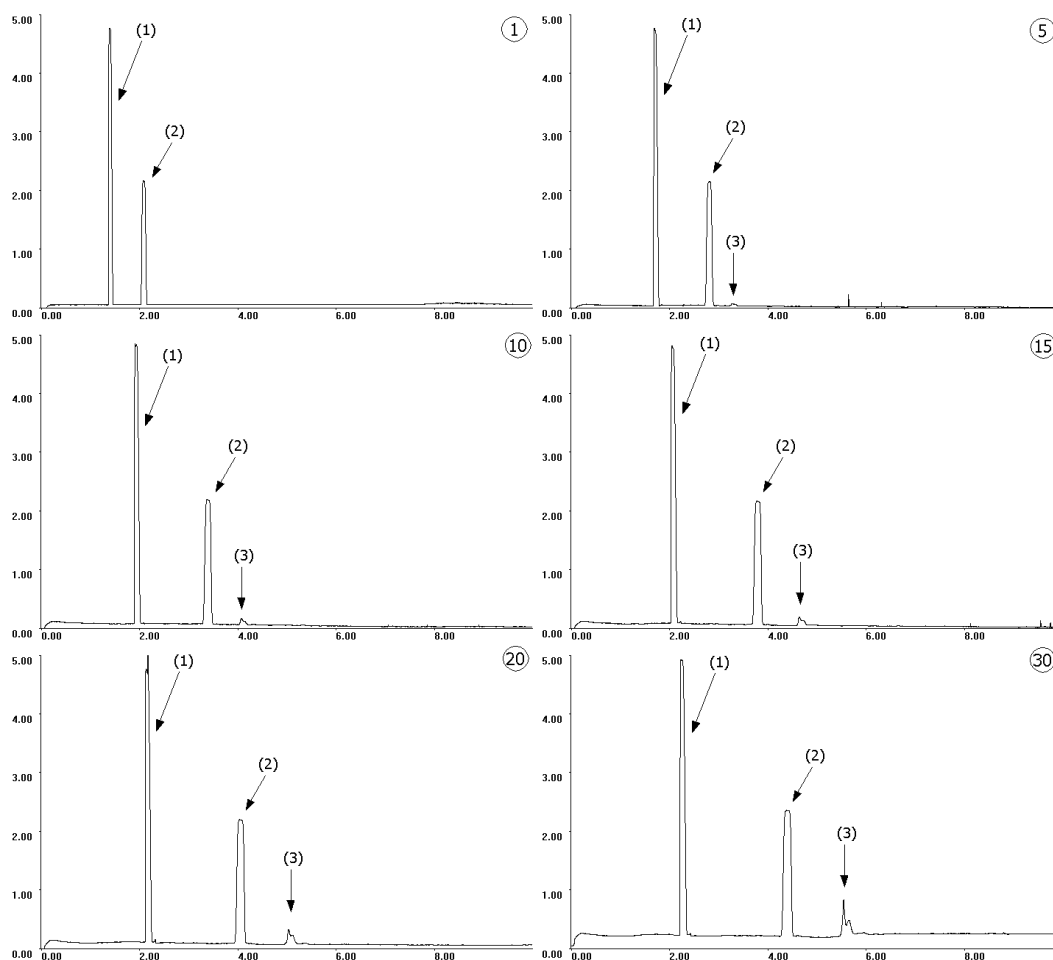


Abbildung 5.6: Cytochrom C ( $\sim 14$  ng pro Injektion; CYTO-290603)  
 Borat-Puffer pH 9,2,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 39 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 3, 5, 09, 12, 24  
 (1) Melamin/Acetanilid, (2) und (3) Cytochrom C

Die Ergebnisse stehen zu Beginn der Messungen im Widerspruch zu den Überlegungen, die im Vorfeld der Versuchsserie gemacht wurden. Aufgrund des vorliegenden pH-Wertes muß zumindest ein Teil des Cytochrom C in kationischer Form vorliegen. Das anfängliche Fehlen von Meßsignalen des Proteins läßt sich damit begründen, daß es durch Coulombsche Wechselwirkungen an der Kapillaroberfläche adsorbiert. Diese These wird durch die deutliche Zunahme der Migrationszeiten der EOF-Marker bestätigt. Das Erscheinen von Proteinpeaks ist von einer Stabilisierung der elektroosmotischen Mobilität begleitet. Gleichzeitig verändert sich das Migrationsverhalten der Proteinfraction (2) im Verhältnis zu den Neutralstoffen.

Zusätzlich wandert das zweite Signal (3) von Cytochrom C aus dem Zeitfenster der Messungen. Diese Konstellation von Beobachtungen läßt sich dadurch erklären, daß zunächst beide Isoformen an der Kapillaroberfläche adsorbiert werden. Nach wenigen Läufen stellt sich aber ein Gleichgewicht zwischen Ad- und Desorption ein. Im

Zeitraum zwischen dem 7. und 10. Lauf kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Migrationszeiten bei einer der Proteinfractionen (2), während die andere (3) aus dem Beobachtungszeitraum verschwindet. Nimmt man an, daß neben der elektrophoretischen Trennung parallel chromatographische Verteilungsprozesse zwischen Glasoberfläche und Trennmedium ablaufen, ergibt sich eine Erklärung dafür, daß ein und dieselbe Proteinfraction mit gleichbleibender Ladung zunächst nach den EOF-Markern beobachtet wird und wenige Läufe später vor diesen das Detektionsfenster passiert. Dieser Verteilungsprozeß scheint das Migrationsverhalten der Makromoleküle im weiteren Verlauf immer weniger zu beeinflussen, so daß sie zunehmend früher detektiert werden. Nimmt man an, daß durch ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ein chromatographischer Retentionsmechanismus bedingt wird, erklärte dies das unterschiedliche und zeitlich veränderliche Migrationsverhalten der Proteinfractionen. Durch die Überlagerung von zonelektrophoretischen und kapillar-elektrochromatographischen Prozessen, kommt es zur Inversion der Migrationsreihenfolge. Unterstellt man zusätzlich, daß die Stärke der Adsorption nach dem Erreichen einer bestimmten Belegungsdichte auf der Oberfläche abnimmt, würde die weniger basische Form im weiteren Verlauf der Messungen weniger durch die fortlaufenden Adsorptionsprozesse beeinflußt werden.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Melamin	10,285	9,352	11,218	2,331	22,667	5,43498
Fläche [AU·min]	Melamin	541,124	504,172	578,077	92,363	17,069	8531,00924
korr. Fläche [AU]	Melamin	55,456	49,536	61,375	14,796	26,681	218,92351
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	2,056	1,685	2,428	0,928	45,102	0,86027
t <sub>Mig</sub> [min]	Cytochrom C	4,656	4,082	5,230	1,171	25,154	1,37158
Fläche [AU·min]	Cytochrom C	1077,740	944,937	1210,542	271,031	25,148	73457,5394
korr. Fläche [AU]	Cytochrom C	235,083	213,089	257,076	44,886	19,094	2014,77309

Tabelle 5.3.3.2: Ergebnisse Cytochrom C, pH 9,2 (CYTO-290603)

Folglich nähme die Migrationszeit dieses Analyten immer mehr ab, während die anderen Substanzen durch die fortlaufende Verminderung des EOF langsamer migrieren. Der Zusammenbruch des Gesamtsystems nach dem 24. Lauf läßt sich damit erklären, daß die gebildeten Proteinplaques eine bestimmte Dicke erreicht haben und sich das Grenzflächenpotential durch Alterungsprozesse sprunghaft ändert. Betrachtet man die statistische Auswertung der Läufe bei pH 9,2 (Tab. 5.3.3.2), so läßt sich Cytochrom C auch unter diesen Bedingungen nicht quantitativ und reproduzierbar bestimmen.

### 5.3.4 Untersuchungen bei pH 10,5

Bei den Untersuchungen bei pH 10,5 wird ein 100 mM Borat-Puffer verwendet. Dieser pH-Wert liegt oberhalb des theoretischen IP von Cytochrom C. Die in der Literatur [123][124] publizierten IP liegen knapp unterhalb des pH-Wertes des Puffers. Daher sind keine Überschneidungen mit einem kationischen internen Standard, wie dem verwendeten Neostigminbromid, zu erwarten. Zusätzlich wird Acetanilid als EOF-Marker verwendet. Beide Substanzen werden im Puffer gelöst.

Bedingt durch die Differenz zwischen dem eingestellten pH-Wert und dem  $pK_s$ -Wert von Borsäure (9,2) ist die Pufferkapazität des Systems gering. Daher kommt der einleitenden Ermittlung der Systempräzision entsprechende Bedeutung zu.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	1,766	1,757	1,775	0,026	1,464	0,00067
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	113,313	112,875	113,750	1,222	1,078	1,49332
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid	64,167	63,819	64,515	0,973	1,516	0,94640
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	10,873	10,817	10,929	0,156	1,438	0,02443

Tabelle 5.3.4.1: Ergebnisse Acetanilid, Systempräzision pH 10,5 (CYTO-241103)

Die Ergebnisse aus 30 Läufen sind in Tab. 5.3.4.1 für den EOF-Marker Acetanilid zusammengefaßt. Die RSD% der elektroosmotischen Mobilität beträgt 1,438%. Dieser Wert liegt zwar etwa 0,5% über den Werten, die unter anderen Bedingungen erhalten werden können, dennoch ist die Präzision für  $\mu_{\text{EOF}}$  akzeptabel. Zum einen sind die Migrationszeiten so kurz, daß die Standardabweichung von knapp 1,5 s zu der entsprechenden RSD% führt. Zum anderen ist der absolute Wert von  $\mu_{\text{EOF}} = 10,9 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  sehr hoch und ermöglicht es, adsorptionsbedingte Einflüsse auf den EOF sicher zu erfassen. Berücksichtigt man nur die Läufe 3-30, reduziert sich die RSD% des EOF auf 1%, so daß die notwendige Systemstabilität gewährleistet ist.

In Abbildung 5.7 sind die die Läufe 1, 5, 10, 15, 20 und 30 der Meßreihe abgebildet, die zur Illustration der Ergebnisse beitragen. Auch bei pH 10,5 läßt sich das Phänomen beobachten, daß sich im ersten Lauf der Serie das Protein nicht detektieren läßt. Im Verlauf der Meßreihe lassen sich folgende Effekte beobachten:

- Zunahme der Migrationszeiten aller Substanzpeaks
- deutliche Zunahme der korrigierten Peakfläche des Proteins
- zwei Peak-Maxima bei Cytochrom C.

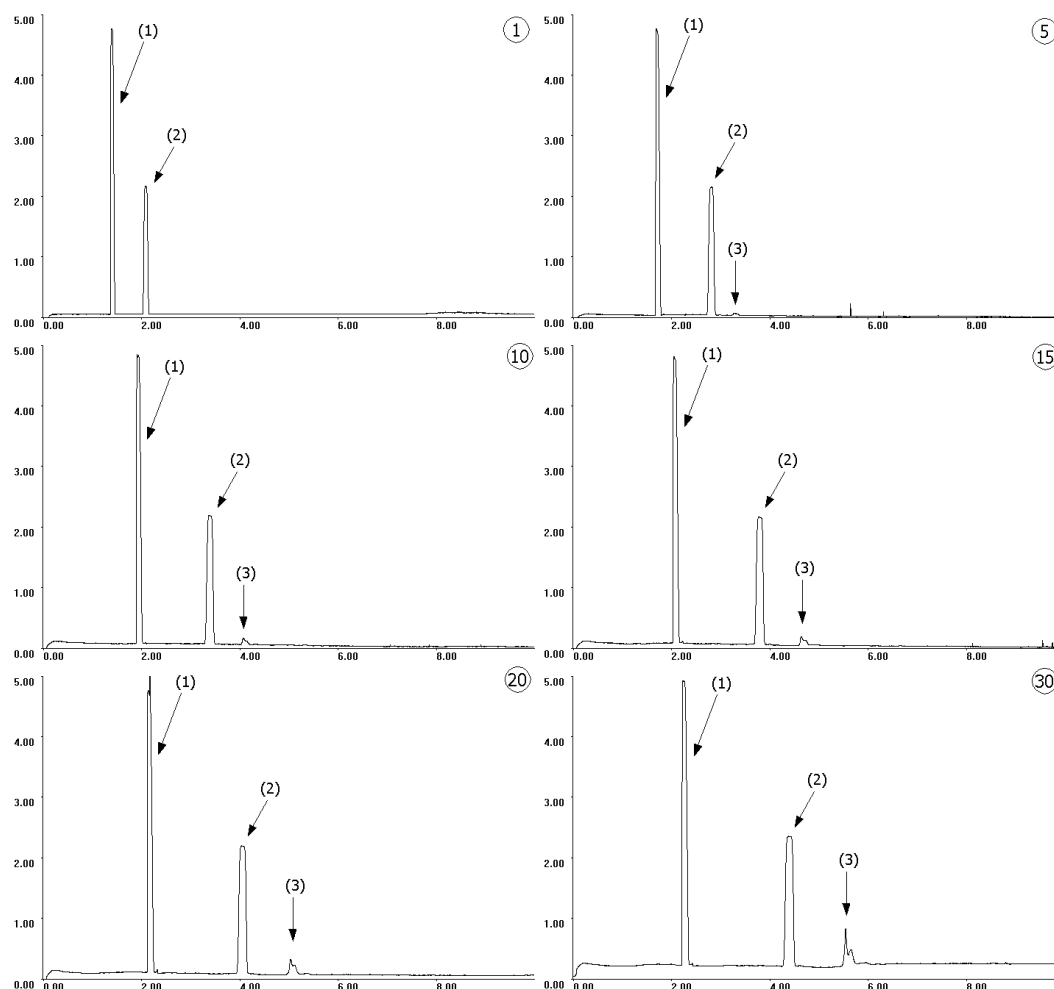


Abbildung 5.7: Cytochrom C ( $\sim 3$  ng pro Injektion; CYTO-241103)  
Borat-Puffer pH 10,5,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Cytochrom C

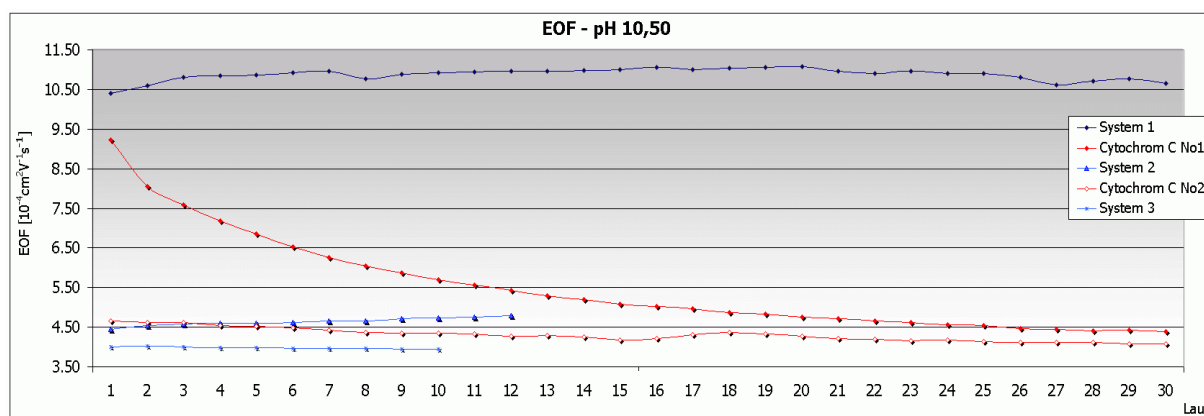


Abbildung 5.8: Ergebnisse EOF pH 10,5 (CYTO-241103)

Es fällt auf, daß der Abfall des EOF einer logarithmischen Funktion gehorcht und sich asymptotisch einem Grenzwert anzunähern scheint (vgl. Abb. 5.8). Da sich auch die korrigierte Peakfläche des Cytochrom C (3) gegen Ende der Messungen auf einem gleichbleibenden Niveau stabilisiert, hat sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption

und Desorption eingestellt. Ein Teil der statistischen Ergebnisse sind in Tab. 5.3.4.2 zusammengefaßt.

Experiment 1			Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	3,616	3,383	3,850	0,653	18,062	0,42665
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	216,646	203,694	229,598	36,195	16,707	1310,10627
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	60,091	59,616	60,567	1,329	2,212	1,76647
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	5,518	5,081	5,955	1,222	22,149	1,49364
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Cytochrom C	4,638	4,361	4,916	0,736	15,858	0,54098
Fläche	[AU·min]		Cytochrom C	20,543	13,831	27,255	17,794	86,617	316,61091
korr. Fläche	[AU]		Cytochrom C	4,027	2,854	5,200	3,109	77,208	9,66823

Tabelle 5.3.4.2: Ergebnisse Cytochrom C, pH 10,5, Läufe 1-30 (CYTO-241103)

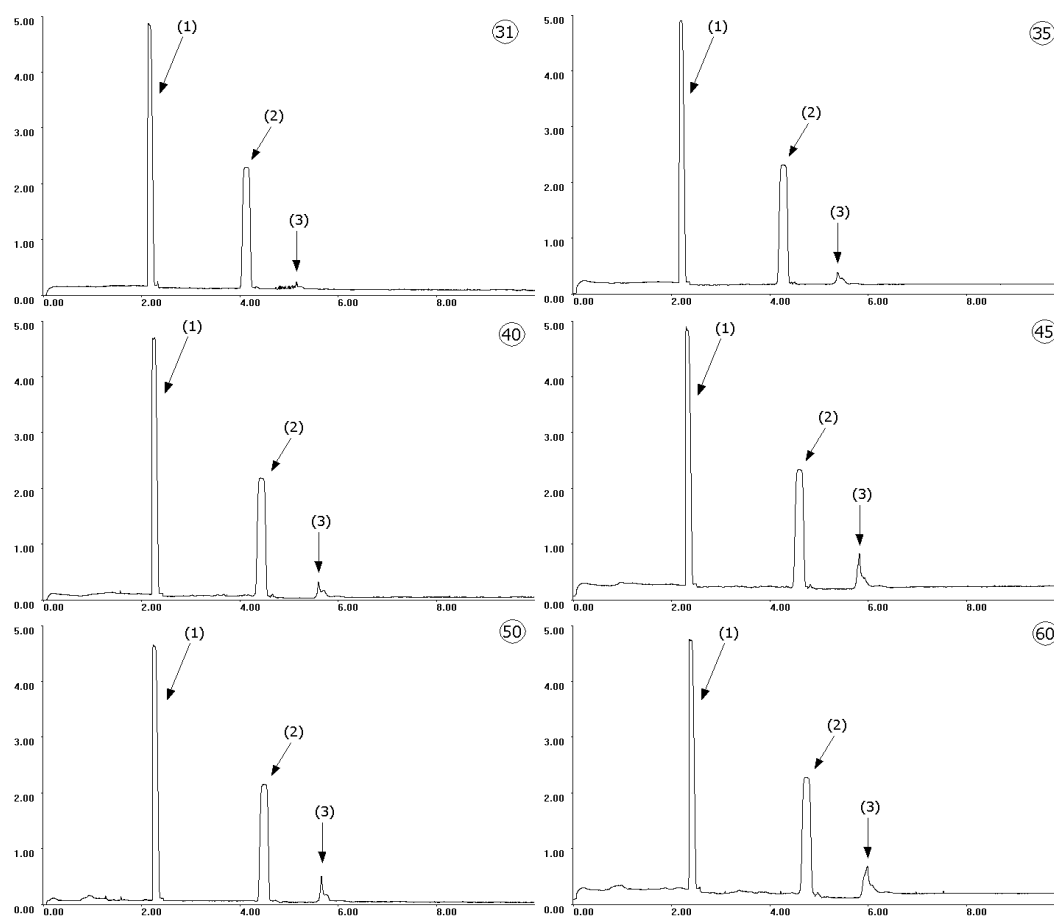


Abbildung 5.9: Cytochrom C ( $\sim 3$  ng pro Injektion; CYTO-241103)  
Borat-Puffer pH 10,5,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \mu\text{A}$ ; Läufe 31, 35, 40, 45, 50, 60  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Cytochrom C

Bei den anschließenden Kontrollläufen (System-Test 2, Tab. 5.3.4.3) streuen die Meßwerte deutlich stärker als zu Anfang der Messungen (Tab. 5.3.4.1). Darüber hinaus sind die Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) trendbehaftet, da der EOF kontinuierlich (ca. 7%) zunimmt.

## 5 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Systempräzision 2			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid		4,140	4,089	4,191	0,090	2,168	0,00805
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		255,981	253,806	258,156	3,844	1,502	14,77438
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid		61,850	61,212	62,487	1,127	1,822	1,26959
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid		4,640	4,583	4,696	0,100	2,150	0,00995

Tabelle 5.3.4.3: Ergebnisse Systempräzision 2, pH 10,5, Läufe 1-12 (CYTO-241103)

Außerdem treten in den Elektropherogrammen geringe, temporäre Schwankungen der Basislinie auf. Diese Beobachtungen werden so interpretiert, daß ein Teil des adsorbierten Proteins ausgewaschen wird, die Kieselglasoberfläche wieder frei wird und so die Zunahme des EOF auslöst.

Aus diesem Grund wird nach den Kontrollversuchen eine zweite Meßreihe mit dem Protein (Cytochrom C 2, Abb. 5.9) durchgeführt. Mit dieser Vorgehensweise soll geklärt werden, ob die Mutmaßungen richtig sind. Sollte im Verlauf dieser Untersuchungen der EOF erneut geringfügig abnehmen und gleichzeitig die korrigierte Peakfläche des makromolekularen Analyten zunehmen, würde dies die beschriebene Annahme stützen. Anhand der ausgewählten Elektropherogramme lassen sich die Veränderungen innerhalb der zweiten Meßreihe mit Cytochrom C zeigen (vgl. Tab. 5.3.4.4). Neben einer geringfügigen Zunahme der Migrationszeiten aller Analyten läßt sich die deutliche Zunahme der Peakfläche des Proteins dokumentieren. Diese ist allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den Läufen 1-30 und unterliegt ab dem 15. Lauf deutlich meßbaren Schwankungen.

Experiment 2			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid		4,467	4,406	4,528	0,171	3,823	0,02917
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		275,535	272,989	278,081	7,114	2,582	50,60821
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid		61,722	61,166	62,278	1,553	2,516	2,41122
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid		4,304	4,244	4,364	0,168	3,903	0,02822
t <sub>Mig</sub>	[min]	Cytochrom C		5,639	5,557	5,721	0,229	4,068	0,05263
Fläche	[AU·min]	Cytochrom C		34,753	28,513	40,993	17,438	50,176	304,07211
korrr. Fläche	[AU]	Cytochrom C		6,056	5,024	7,088	2,883	47,611	8,31408

Tabelle 5.3.4.4: Ergebnisse Cytochrom C, pH 10,5, Läufe 31-60 (CYTO-241103)

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten werden besonders deutlich, wenn man die korrigierten, und damit von der Migrationsgeschwindigkeit unabhängigen, Peakflächen des internen Standards mit denen des Proteins in Abb. 5.10 vergleicht. Während die Werte für Neostigmin insgesamt nur 2,35% über 112 Läufe schwanken, liegen die RSD% für Cytochrom C in der ersten Meßreihe bei 77% und in der zweiten bei knapp 48%.

Zusätzlich sind für das Protein Trendlinien in Form von Polynomen 6. Ordnung eingezeichnet (Online-Hilfe, Excel 2002), welche die Interpretation erleichtern. Das Ergebnis der zweiten Meßreihe bestätigt die Annahme, daß Cytochrom C bei einem pH-Wert in der Nähe des IP an der Kieselglasoberfläche adsorbiert. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse auch, daß dieser Prozeß teilweise reversibel ist und sich die Adsorbate partiell durch einfaches Spülen mit Pufferlösung auswaschen lassen. Wird die Kapillare erneut mit dem Protein in Kontakt gebracht, so laufen erneut Adsorptionsprozesse ab. Diese beeinflussen die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten zwar auch, allerdings sind die Einflüsse weniger ausgeprägt.

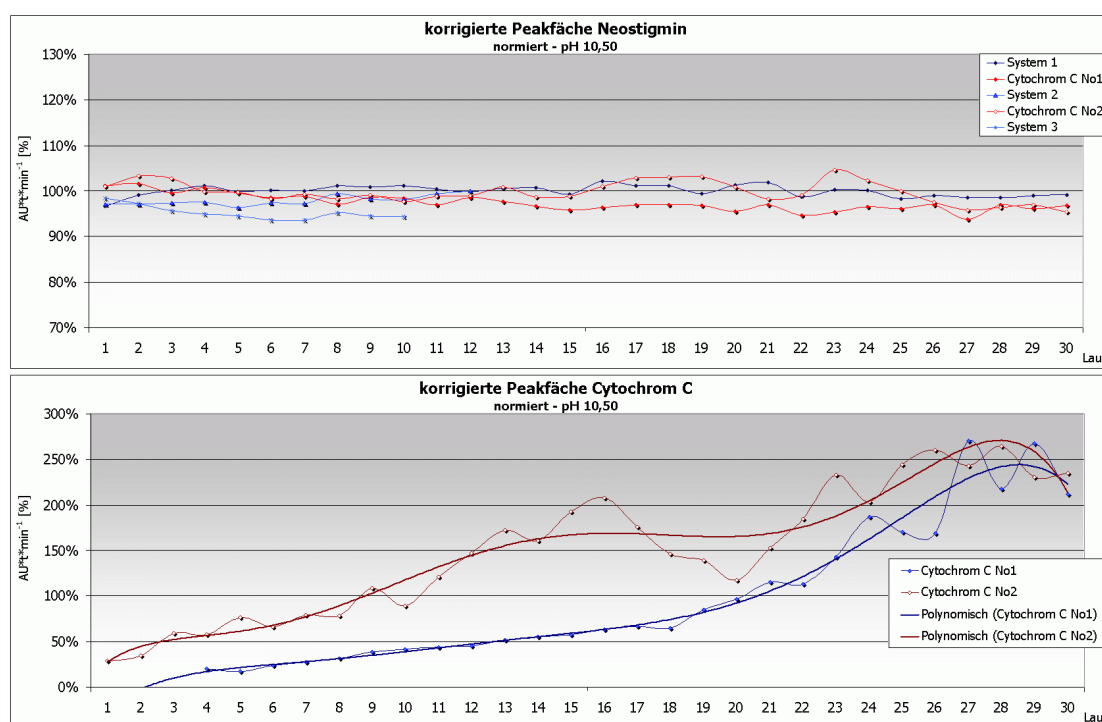


Abbildung 5.10: Vergleich korrigierte Peakflächen pH 10,5

Die Ergebnisse der dritten Kontrollreihe (Tab. 5.3.4.5) legen die Schlußfolgerung nahe, daß eine Desorption ab einen bestimmten Zeitpunkt nicht mehr möglich ist. Cytochrom C wird zwar als stabiles Protein mit einer in-vitro-Halbwertszeit von 30 Std. eingestuft, allerdings weichen die Versuchsbedingungen vom Optimum ab und berücksichtigen nicht den möglichen Einfluß der Glasoberfläche auf die Tertiärstruktur. Während die Migrationszeiten in der zweiten Serie von Kontrollversuchen noch geringfügig abnehmen, beobachtet man vielmehr bei den Läufen 103-112 eine unbedeutende Zunahme. Die geringe Streuung kann darauf zurückgeführt werden, daß sich die Kapillaroberfläche durch die Alterung der Proteinplaques verändert. Dadurch wird die Tendenz des Proteins, auf der Kapillaroberfläche zu adsorbieren, reduziert.

Systempräzision 3			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	4,828	4,810	4,846	0,030	0,612	0,00087
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	284,192	282,394	285,990	2,901	1,021	8,41339
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	58,865	58,329	59,402	0,866	1,471	0,74942
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	3,977	3,962	3,992	0,024	0,613	0,00059

Tabelle 5.3.4.5: Ergebnisse Systempräzision 3, pH 10,5, Läufe 1-10 (CYTO-241103)

### 5.3.5 Untersuchungen bei pH 11,0

Für die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Cytochrom C wird bei pH 11,0 ein 50 mM Phosphat-Puffer benutzt. Obwohl der pH-Wert über eine Einheit vom Pufferschwerpunkt entfernt ist, wird dieses System verwendet, da als Alternative lediglich ein CAPS-Puffer (CAPS = N-Cyclohexyl-3-aminopropan-1-sulfonsäure) zur Verfügung steht. Dieser läßt sich jedoch nur bis zu einer Wellenlänge von 220 nm verwenden. Da die zwitterionische Puffersubstanz außerdem selbst an der Kieselglasoberfläche adsorbieren kann, weist sie Merkmale eines dynamischen Modifiers auf. Anstelle von Neostigminbromid wird Melamin als interner Standard verwendet, da die Stabilität des Carbamoylsäure-Derivates unter alkalischen Bedingungen zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Peakflächen führen kann.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Melamin	3,345	3,328	3,362	0,047	1,418	0,00225
Fläche	[AU·min]		Melamin	155,769	155,140	156,397	1,757	1,128	3,08748
korr. Fläche	[AU]		Melamin	46,574	46,299	46,848	0,767	1,648	0,58903
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Melamin	5,741	5,712	5,770	0,081	1,414	0,00659

Tabelle 5.3.5.1: Systempräzision pH 11,0, vor der Untersuchung von Cytochrom C (CYTO-130104)

Aus diesen Gründen wird auch bei diesem pH-Wert zunächst die Systempräzision bestimmt, deren Ergebnisse in Tab. 5.3.5.1 zusammengefaßt sind. Im Anschluß wird das globuläre Protein untersucht. Im Gegensatz zu den bisherigen Meßreihen verändert sich das Peakmuster während der Läufe nur unwesentlich (Abb. 5.11). Sowohl die Migrationszeiten des EOF-Markerpeaks (1) und des Proteins (2), als auch deren Peakflächen, weisen eine geringe Streuung auf (Tab. 5.3.5.2).

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$	
t <sub>Mig</sub>	[min]	Melamin	3,476	3,464	3,487	0,033	0,952	0,00109
Fläche	[AU·min]	Melamin	153,894	153,250	154,539	1,801	1,170	3,24286
korr. Fläche	[AU]	Melamin	44,280	44,135	44,425	0,405	0,915	0,16398
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Melamin	5,525	5,506	5,544	0,053	0,953	0,00277
t <sub>Mig</sub>	[min]	Cytochrom C	4,014	4,002	4,026	0,035	0,863	0,00120
Fläche	[AU·min]	Cytochrom C	24,285	24,058	24,512	0,634	2,609	0,40149
korr. Fläche	[AU]	Cytochrom C	6,050	5,995	6,105	0,154	2,551	0,02382

Tabelle 5.3.5.2: Ergebnisse Cytochrom C pH 11,0 (CYTO-130104)



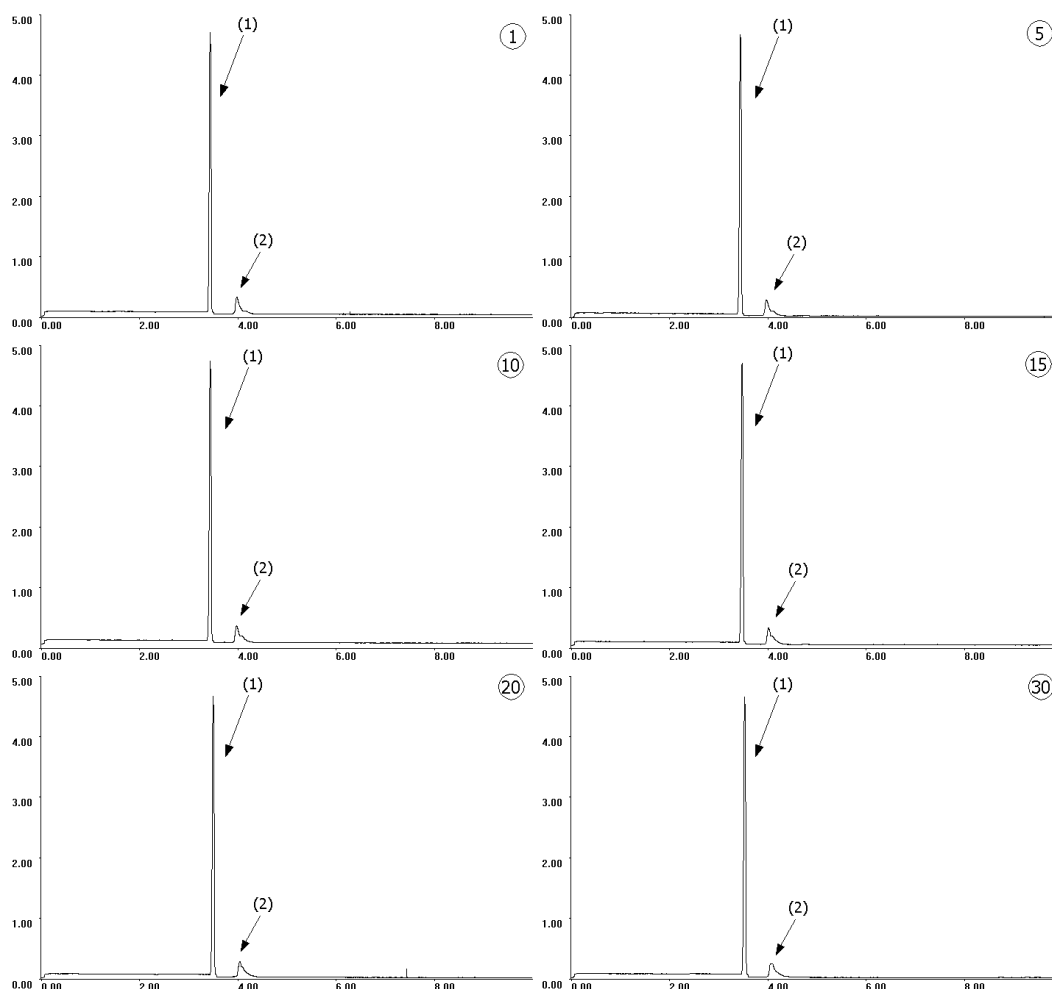


Abbildung 5.11: Cytochrom C ( $\sim 3$  ng pro Injektion; CYTO-130104)  
 Phosphat-Puffer pH 11,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 106 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Melamin/Acetanilid, (2) Cytochrom C

Bei eingehender Betrachtung der Meßwerte fällt eine kontinuierliche Abnahme der elektrophoretischen Mobilität auf. Aufgrund der  $\text{RSD}\% < 1\%$  ist der Trend aber als zufällig einzustufen und läßt sich nicht auf eine mögliche Proteinadsorption zurückführen. Die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Elektropherogrammen bestehen in der Peakform von Cytochrom C. Während sich bei pH 10,5 zwei Fraktionen ausmachen lassen, ist die langsamer migrierende Form nur als Schulter erkennen. Allerdings muß bei pH 11,0 auch berücksichtigt werden, daß die Auflösung durch die höhere Mobilität der Proteinfractionen reduziert wird. Bei der abschließenden Bestimmung der Systempräzision läßt sich eine Abnahme der Migrationszeiten beobachten. Auffällig ist, daß die Werte relevanter Parameter ( $t_{\text{Mig}}$ , korr. AU und  $\mu_{\text{EOF}}$ , Tab. 5.3.5.3) stärker streuen, verglichen mit der einleitenden Systemkontrolle und der Proteinuntersuchung.

Systempräzision 2			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Melamin	3,393	3,344	3,441	0,112	3,287	0,01244
Fläche	[AU·min]		Melamin	158,723	158,058	159,387	1,516	0,955	2,29950
korr. Fläche	[AU]		Melamin	46,839	46,055	47,623	1,789	3,820	3,20062
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]		Melamin	5,665	5,581	5,749	0,192	3,383	0,03673

Tabelle 5.3.5.3: Systempräzision pH 11,0, nach der Untersuchung von Cytochrom C (CYTO-130104)

Dies ist auch als Grund dafür zu sehen, daß bei der Prüfung auf heteroskedastisch verteilte Stichproben kein signifikanter Unterschied bezüglich der Mittelwerte zwischen beiden Kontrollserien (Irrtumswahrscheinlichkeiten <5%) ermitteln läßt. Aus statistischer Sicht unterscheiden sich die Teilerien, auch in Bezug auf den EOF, so daß gleiche arithmetische Mittel als zufällig eingestuft werden.

Gleichzeitig muß festgehalten werden, daß die vergleichsweise große RSD% bei Peakflächen und korr. Peakflächen von Cytochrom C auf Integrationsprobleme zurückzuführen ist. Das Tailing der Peaks erschwert die korrekte Bestimmung der Peakgrenzen und ist die Ursache für die Varianz. Die geringe RSD% der Migrationszeiten spricht gegen die Annahme, daß es zu einer nennenswerten Adsorption von Cytochrom C kommt.

### 5.3.6 Untersuchungen bei pH 11,5

Bei der elektrophoretischen Untersuchung bei pH 11,5 wird gleichfalls ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet, dessen Pufferkapazität aber höher einzustufen ist als bei pH 11,0. Auch bei dieser Versuchsreihe wird ein Gemisch aus Melamin und Acetanilid als EOF-Marker und interner Standard benutzt. Zu Beginn wird die systemimmanente Streuung ermittelt (Tab. 5.3.6.1). Es fällt auf, daß die Schwankungen vor der eigentlichen Untersuchung über den Vergleichswerten der Meßreihen bei anderen pH-Werten liegen.

Dazu trägt insbesondere die hohe spezifische Leitfähigkeit bei. Die freiwerdende Wärme kann nicht effizient genug abgeführt werden und führt dadurch zur Abnahme der Viskosität während der Messung. Dies führt u.a. zu der beobachteten Zunahme des EOF.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Melamin	4,057	4,021	4,093	0,100	2,468	0,01003
Fläche	[AU·min]		Melamin	835,628	830,938	840,318	13,107	1,568	171,78466
korr. Fläche	[AU]		Melamin	206,107	203,818	208,397	6,397	3,104	40,92338
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]		Melamin	7,399	7,335	7,463	0,180	2,431	0,03236

Tabelle 5.3.6.1: Systempräzision pH 11,5, vor der Untersuchung von Cytochrom C (CYTO-190104)

Im Verlauf der Messungen mit Cytochrom C nehmen die effektiven Mobilitäten der Markersubstanzen (1) und des Proteins (2) ab deutlich ab (vgl. Abb. 5.12).

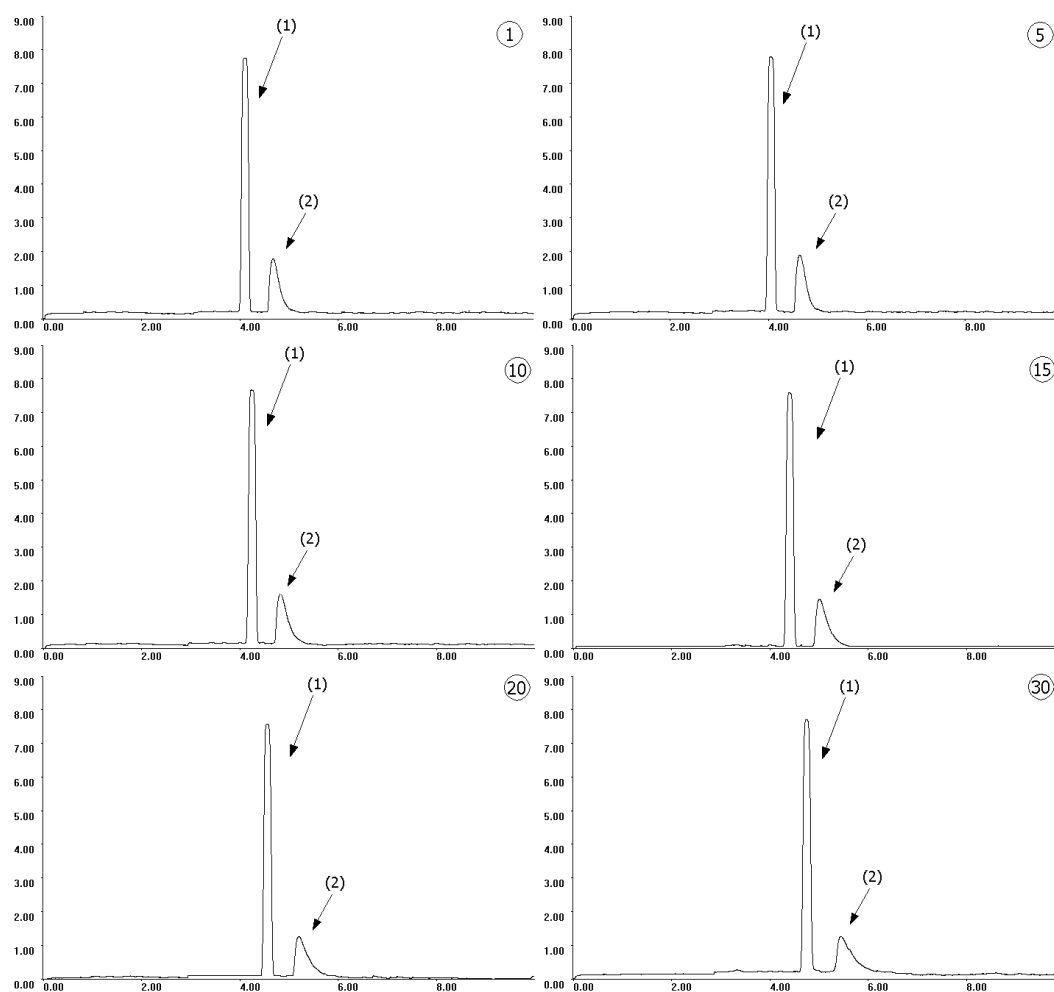


Abbildung 5.12: Cytochrom C ( $\sim 3$  ng pro Injektion; CYTO-190104)  
Phosphat-Puffer pH 11,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 113 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Melamin/Acetanilid, (2) Cytochrom C

Die RSD% der Migrationszeiten liegen mit 5,5% bzw. 5,6% deutlich über den Ergebnissen der vorausgegangenen Kontrollversuche (Tab. 5.3.6.2).

Darüber hinaus liegt ein deutlicher Trend zu längeren Migrationszeiten vor, der sich in abgeschwächter Form auch bei der anschließenden Kontrollserie fortsetzt. Vergleicht man die korrigierten Peakflächen von Cytochrom C und dem Melamin/ Acetanilid-Gemisch aus dem Hauptversuch, zeigt sich die gleiche abnehmende Tendenz. Die Versuche bei pH 7,0 bis 10,5 zeigen, daß die Adsorption zu Beginn der Messungen auftritt und im weiteren Verlauf abnimmt. Die hier beobachtete Zunahme der Migrationszeiten bei gleichzeitiger Abnahme der korr. AU-Werte ist so zu interpretieren, daß die Adsorption zeitlich verzögert abläuft. Diese These muß aufgrund des Verhaltens der internen Standards verworfen werden, da sich deren korr. AU ebenfalls ver-

ringert. Die Adsorption von Protein würde sich entweder nicht auf die korrigierte Peakfläche der Vergleichssubstanzen auswirken oder, im Gegensatz zu den Beobachtungen, zu einer Zunahme führen. Allein eine massive Proteinadsorption, die zu einer deutlichen Verjüngung des Innendurchmessers führt, hätte ähnliche Auswirkungen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	4,384	4,297	4,470	0,241	5,501	0,05814
Fläche [AU·min]	Melamin	857,561	851,717	863,404	16,329	1,904	266,63964
korrr. Fläche [AU]	Melamin	196,032	193,230	198,835	7,832	3,995	61,33559
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	6,864	6,727	7,000	0,381	5,556	0,14543
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Cytochrom C	5,009	4,908	5,110	0,283	5,643	0,07991
Fläche [AU·min]	Cytochrom C	261,311	256,627	265,994	13,088	5,009	171,30859
korrr. Fläche [AU]	Cytochrom C	52,441	50,549	54,333	5,287	10,081	27,94968

Tabelle 5.3.6.2: Ergebnisse Cytochrom C, pH 11,5 (CYTO-190104)

Dies kann aber ausgeschlossen werden, da die Abnahme des EOF viel zu gering ist, um diesen Effekt auszulösen. Vielmehr muß eine andere Ursache in Betracht gezogen werden. Durch eine Temperaturabnahme lassen sich die beobachteten Effekte erklären. Durch die Zunahme der Viskosität nimmt einerseits die elektrophoretische Mobilität der Analyten ab (Gl. 11), andererseits führt sie zu einer Reduktion des injizierten Probenvolumens (Gl. 2). Um den Einfluß von möglichen Injektionsproblemen unter diesen Voraussetzungen eliminieren zu können, bezieht man die korrr. AU des Proteins auf jene des internen Standards. Dadurch läßt sich die RSD% von 10,1% auf 6,8% reduzieren.

Systempräzision 2	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	4,688	4,672	4,703	0,035	0,746	0,00122
Fläche [AU·min]	Melamin	900,247	896,259	904,236	9,100	1,011	82,81778
korrr. Fläche [AU]	Melamin	192,052	191,308	192,796	1,697	0,884	2,88110
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	6,400	6,379	6,421	0,048	0,746	0,00228

Tabelle 5.3.6.3: Systempräzision pH 11,5, nach der Untersuchung von Cytochrom C (CYTO-190104)

Zusätzlich muß man bei der Beurteilung den Integrationsfehler für den Proteinpeak berücksichtigen, der sich daran erkennen läßt, daß die Peakgrenze auf der abfallenden Seite des UV-Signals um 6 Sekunden mehr schwankt als auf der ansteigenden Seite. Im Vergleich dazu sind die Schwankungen bei der abschließenden Systemkontrolle (Tab. 5.3.6.3) deutlich geringer.

### 5.3.7 Zusammenfassung und Diskussion

Die durchgeführten Versuchsreihen zeigen deutlich die Problematik bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung von basischen Proteinen auf. Bedingt durch die

Basizität des Analyten liegt dieser über einen weiten pH-Bereich kationisch geladen vor. Im Intervall zwischen etwa pH 2,5 und dem isoelektrischen Punkt treten ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Oberfläche des Kieselglases auf und bedingen die Adsorption an der Phasengrenze.

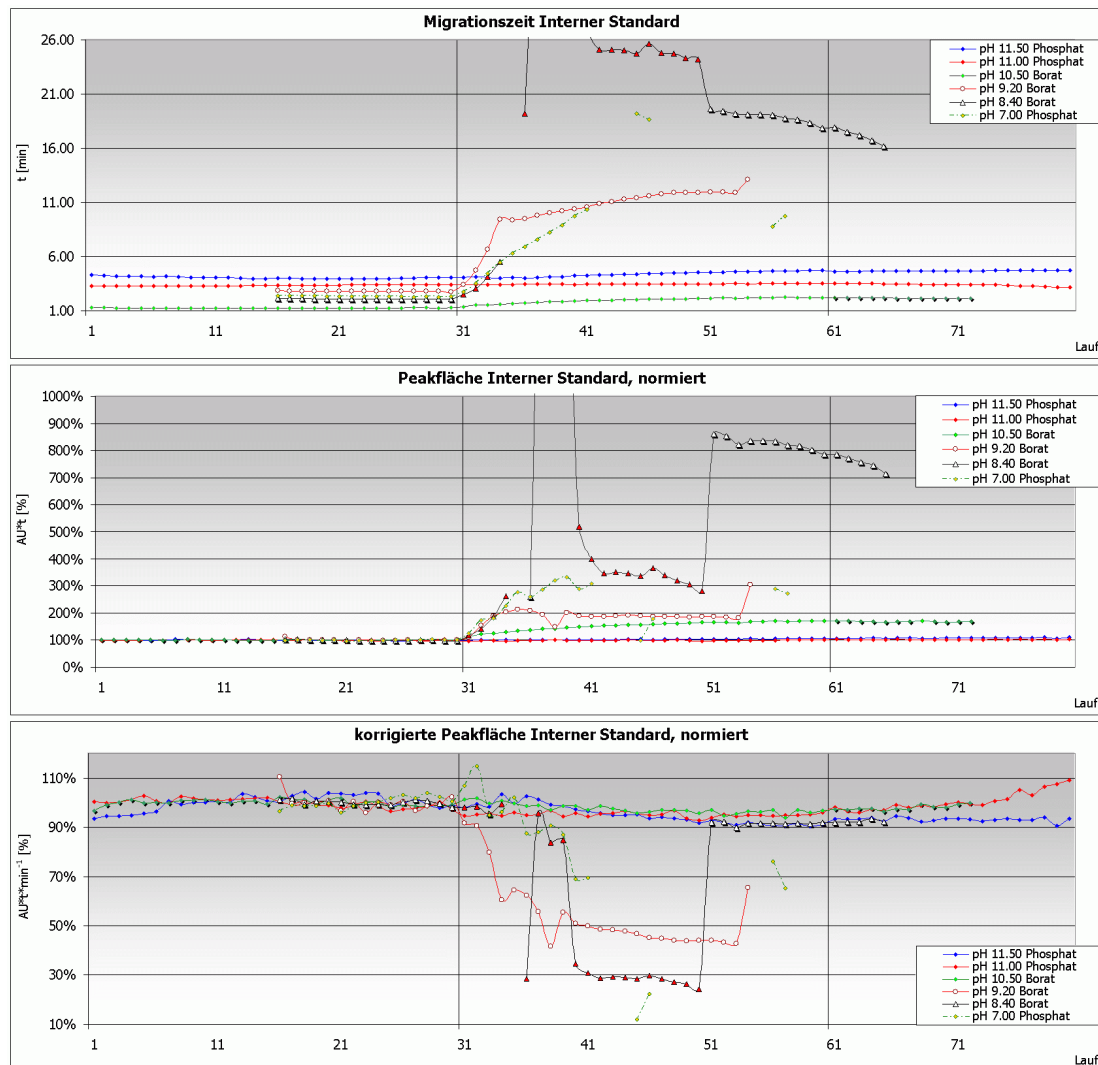


Abbildung 5.13: Ergebnisse interner Standard gesamt

In Abbildung 5.13 sind die Ergebnisse für Migrationszeiten, Peakflächen und korrigierte Peakflächen des jeweils verwendeten internen Standards bzw. EOF-Markers graphisch dargestellt. Die vertikalen Linien begrenzen dabei den jeweiligen Abschnitt der Versuchsreihen. Anhand dieser Darstellung wird deutlich, daß die Leistungsfähigkeit des Systems bei pH-Werten zwischen 7,0 und 9,2 stark beeinträchtigt wird. Dies führt dazu, daß sogar die korrigierten Peakflächen als zeitunabhängige Größe deutlichen Schwankungen unterliegen. Bei pH 10,5 nimmt die Streuung der Meßgrößen ab, wobei innerhalb der Versuchsreihe mit dem Protein die Migrationszeiten um 14% und die Peakflächen um 53% deutlich zunehmen. Erst bei pH-Werten oberhalb

des IP von Cytochrom C liegen analytisch stabile Verhältnisse vor. Die Temperaturprobleme während der Meßserie bei pH 11,5 werden dabei nicht berücksichtigt.

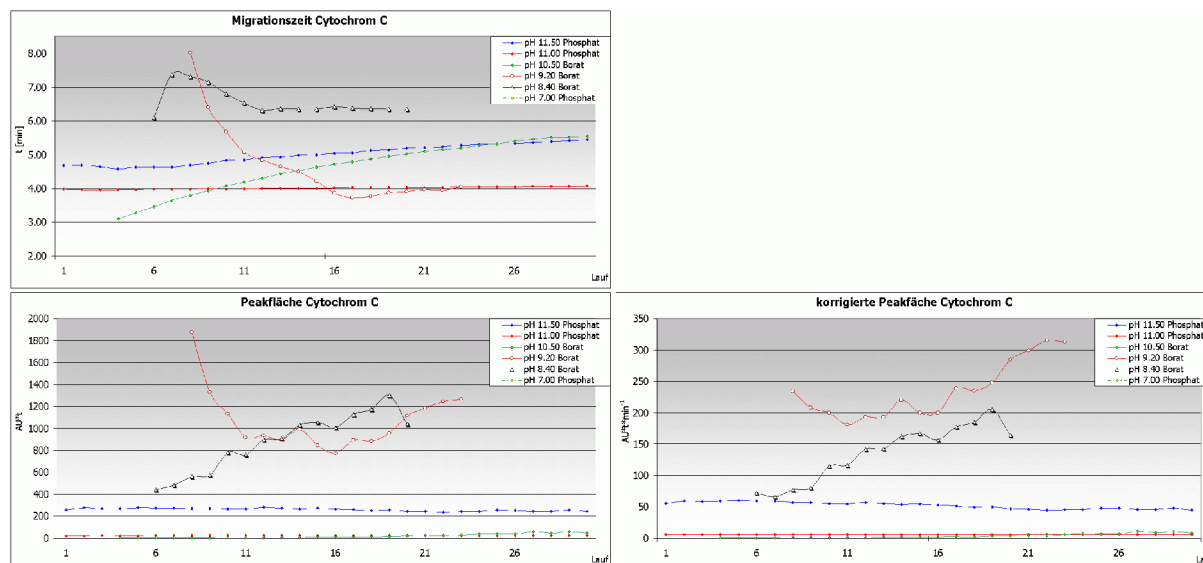


Abbildung 5.14: Ergebnisse Cytochrom C gesamt

Während die Analyse der Meßdaten des internen Standards nur allgemeine Rückschlüsse auf die Stabilität des gesamten Systems zuläßt, sind die Ergebnisse für das Protein wesentlich wichtiger. Die Meßwerte von Cytochrom C sind in Abb. 5.14 zusammengefaßt. Bei den Migrationszeiten ist hervorzuheben, daß durch die Überlagerung von elektrophoretischen und chromatographischen Prozessen bei der Meßserie bei pH 9,2 eine Abnahme der Migrationszeiten beobachtet wird, allerdings nur für eine der Proteinfraktionen. Die zweite zeigt hingegen ein ähnliches Verhalten wie auch bei anderen pH-Werten unterhalb des IP, läßt sich aber nur in wenigen Läufen beobachten. Konstante Migrationszeiten werden erst oberhalb von pH 10,5 erhalten. Bei der graphischen Darstellung der AU bzw. korr. AU ergibt sich das Problem, daß sich die einzelnen Meßreihen durch die unterschiedlichen Einwaagen, pH-Werte und Migrationsgeschwindigkeiten unterscheiden und deshalb große Unterschiede zwischen den Meßgrößen resultieren.

Um dennoch eine sinnvolle und vergleichbare graphische Darstellung zu erhalten, werden im folgenden die Werte von AU und korr. AU verwendet, die auf den Mittelwert der jeweiligen Reihe normierten werden (Abb. 5.15). Durch diese Darstellungsweise läßt sich verdeutlichen, daß eine verlässliche Quantifizierung des Proteins bei pH 11,0 und 11,5 möglich ist, wenn auch mit gewissen Streuungen behaftet.

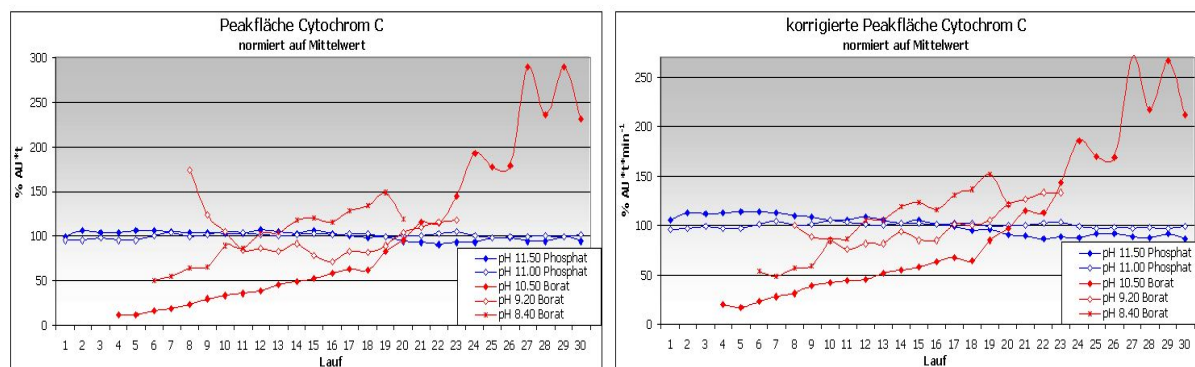


Abbildung 5.15: normierte Ergebnisse Cytochrom C

Aus den Ergebnissen läßt sich ableiten, daß eine analytische Methode unterhalb des IP in unbeschichteten Kieselglaskapillaren kaum zu realisieren ist. Nimmt man die Veränderung des EOF als indirekten Indikator, so sind die Bedingungen bei pH 8,4 am kritischsten einzustufen, da hier der stärkste und schnellste Abfall beobachtet wird (Abb. 5.16). Vergleicht man die Entwicklung des EOF bzw. der elektroosmotischen Mobilität, so ist der Abfall bei pH 7,0 und 8,4 etwa vergleichbar (Abnahme um ca. 90%), erfolgt bei pH 8,4 jedoch schneller.

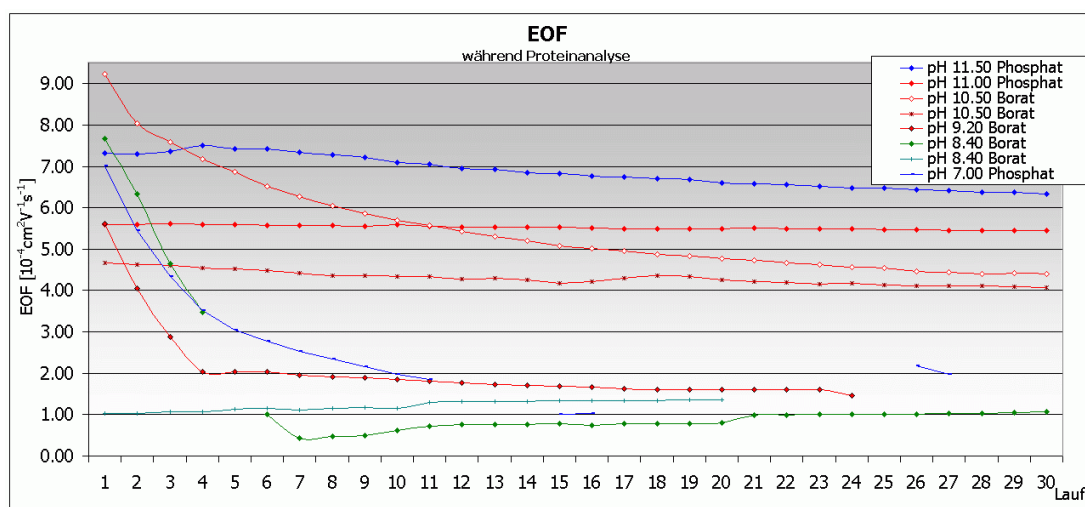


Abbildung 5.16: Veränderung des EOF

In diesem Bereich tragen ausschließlich die Seitenketten von Lysin ( $pK_s$  10,54) und Arginin ( $pK_s$  Arg 12,48) zur positiven Ladung bei, während die Histidin-Seitenketten ( $pK_s$  6,04) ungeladen vorliegen. Die Oberflächenladung von Cytochrom C verändert sich daher in dem Intervall von pH von 7,0 bis 8,4 nur unwesentlich. Im Gegensatz dazu nimmt in diesem Bereich die Ladungsdichte auf der Kieselglasoberfläche noch durch die Deprotonierung von Silanol-Gruppen zu. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit von ionischen Wechselwirkungen zwischen Analyt und Kapillare, so daß die Adsorption möglicherweise beschleunigt wird. Als weitere Einflußgröße sind die Pufferio-

nen zu berücksichtigen, da Phosphate in der ionischen Hülle des Proteins stärker zur Ladungsabschirmung beitragen als Borat. Zusätzlich trägt Phosphat aufgrund seiner Stellung in der Hofmeister-Serie zur Stabilisierung der Proteinstruktur bei [3].

Bei pH 9,2 beobachtet man eine weniger ausgeprägte Änderung des EOF. Dies läßt sich auf eine im zeitlichen Mittel gesehene partielle Deprotonierung von Tyrosin- und Lysinresten zurückführen, die zu einer Reduktion der Nettoladung und des Oberflächenpotentials von Cytochrom C führt. Der Prozeß setzt sich bei pH 10,5 weiter fort, erkennbar an der verbesserten Reproduzierbarkeit.

Im Balkendiagramm sind die Durchschnittswerte des EOF dargestellt (Abb. 5.17), wobei der Fehlerbalken das 5%-Konfidenzintervall des Mittelwertes bezeichnet. Vergleicht man die statistischen Werte für den EOF aus allen Teilabschnitten der Meßreihen in einer graphischen Darstellung, sind kritische Bedingungen leicht zu erkennen.

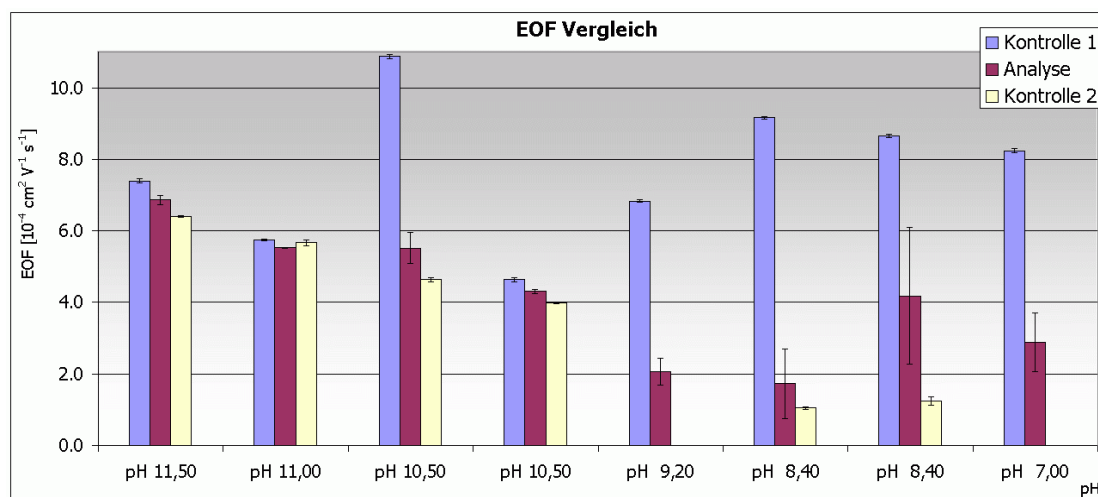


Abbildung 5.17: Cytochrom C ,Vergleich von pH und EOF

Während sich die Balken von Meß- und Kontrollreihen bei hohen pH-Werten nur unwesentlich unterscheiden, treten unter kritischen Bedingungen ( $\text{pH} < 10,5$ ) deutliche Unterschiede auf. Diese lassen sich durch die Bildung von Proteinadsorbaten auf der Kapillaroberfläche erklären. Auffällig ist, daß sich die Fehlerbalken, mit Ausnahme der Kontrollversuche bei pH 11,0, nicht überschneiden. Die Entscheidung, ob statistisch signifikante Unterschiede vorliegen, wird anhand der Prüfung auf homo- und heteroskedastisch verteilte Daten getroffen. Als Irrtumswahrscheinlichkeiten werden 1%, 2% bzw. 5% akzeptiert.

Aus Untersuchungen der Atmungskette ist bekannt, daß Cytochrom C als Bindestelle zwischen den Komplexen III und IV fungiert. Die Lokalisation im Intermembranraum



der Mitochondrien wird durch anionische Strukturen der inneren Membran gesteuert [105]. Die Eigenschaft, sowohl ionische als auch van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Oberflächen einzugehen, beschränkt sich nicht nur auf physiologische Phasengrenzen. Untersuchungen von Santos, et al. zum Adsorptionsverhalten an Quarzoberflächen mittels der Slab optical wave guide spectroscopy (SOWG) zeigen [123], daß das Ausmaß der Adsorption vom pH-Wert, der Ionenstärke der Lösung und der Proteinkonzentration abhängt. Die durchgeführten Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Adsorptionsisotherme zeigen einen sigmoiden Verlauf, wenn die adsorbierte Proteinmenge gegen den pH-Wert aufgetragen wird. Ab etwa pH 9,7 nimmt die Adsorption mit zunehmender Basizität der Lösung ab. Andere Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten, die mittels der Totalreflexions-UV-Spektroskopie (TIRA, total internal reflection absorption spectroscopy) [124] durchgeführt wurden, kommen zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings ist die Adsorption bei pH 8,5 am ausgeprägtesten. Somit zeigen die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen eine gute Übereinstimmung mit diesen Quellen.

Parallel zu den TIRA-Experimenten sind Versuche mittels der Soret-Bandenspektroskopie durchgeführt worden, die zeigen, daß im pH-Bereich zwischen 4 und 9 keine Verschiebungen des Absorptionsmaximums bei dem adsorbierten Cytochrom C auftreten. Diese werden typischerweise durch Änderungen der Proteinstruktur hervorgerufen. Folglich kann angenommen werden, daß die Liganden des Eisens im Protoporphyrin IX Ringsystem ihre Position, relativ zum Zentralatom, nicht verändern. Zusätzlich bietet dieses Analysenverfahren die Möglichkeit, den Winkel zwischen dem Protoporphyrin-Gerüst und der Kieselglasoberfläche zu bestimmen. Dieser beträgt  $\theta_p = 41^\circ$  und bleibt zwischen pH 4 und 9 konstant und ändert sich auch nicht in Folge des Belegungsgrades der Oberfläche. Die Isotherme wird mit  $\Gamma = 1,4 \cdot 10^{13}$  Molekülen pro  $\text{cm}^2$  ( $\approx 140 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) angegeben. Erst in stärker saurer bzw. alkalischer Lösung läßt sich die Zerstörung der nativen Tertiärstruktur beobachten.

In Bezug auf die Kapillarelektrophorese bedeutet dies, daß gerade bei den Messungen mit den am wenigsten reproduzierbaren Ergebnissen, die Stabilität der Proteinstruktur nicht primär als Ursache in Frage kommt. In diesem Zusammenhang scheint eine Besonderheit von Cytochrom C bedeutsam zu sein. Selbst unter stark denaturierenden Bedingungen mit 10 M Harnstoff und SDS, kommt es nach dem Entfernen

der chaotropen Reagenzien zur spontanen, partiellen Rückbildung der nativen Struktur [122], wobei auch das Ausmaß der Denaturierung eine Rolle spielt. Sofern die Sekundärstruktur nicht vollständig zerstört wird, trägt das Protoporphyrin IX / Fe(III) System zur beschleunigten Rekonstitution der Tertiärstruktur bei, wobei diese Prozesse teilweise in der Größenordnung von wenigen  $\mu\text{s}$  liegen [125].

Bei den SOWG-Versuchen in [123] wird auch die Belegungsdichte untersucht. Unter der Annahme, daß Cytochrom C eine dichtgepackte, monomolekulare Schicht auf Glasoberflächen ausbildet, ergibt sich als Grenzwert eine Grenzflächenkonzentration von etwa  $22 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Die Innenoberfläche der verwendeten Kapillaren (I.D.  $50 \mu\text{m}$ ,  $l_{\text{ges}} 60 \text{ cm}$ ) beträgt ca.  $0,95 \text{ cm}^2$ , so daß ca. 20 Injektionen bei pH 8,4 notwendig wären, um die gesamte Oberfläche mit dem Protein zu belegen. Da die ersten Proteinpeaks bereits nach wenigen Läufen beobachtet werden können, läßt sich der Prozeß teilweise durch eine Langmuirsche Adsorptionsisotherme beschreiben.

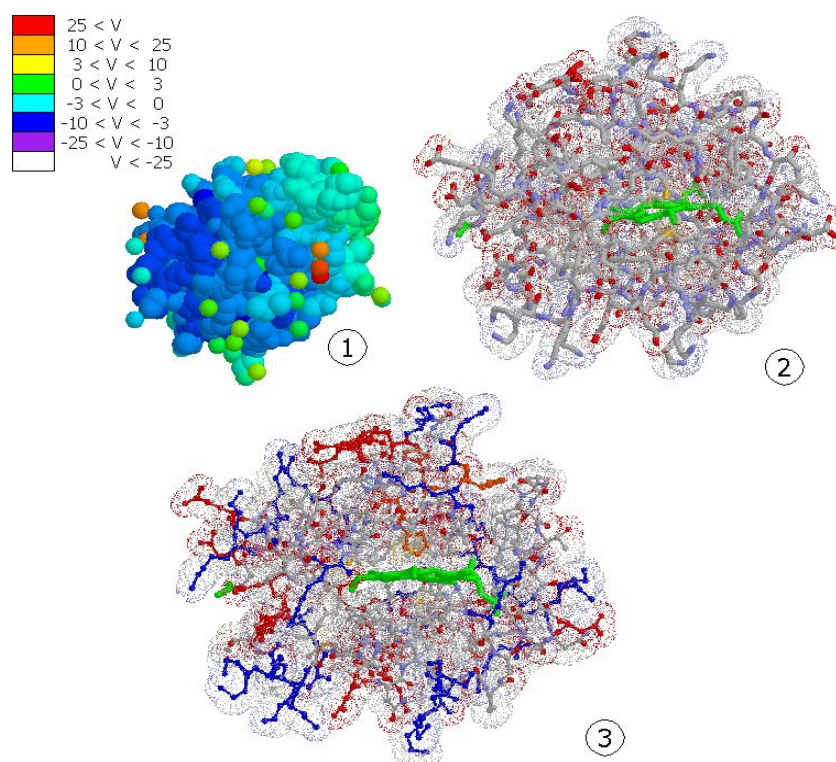


Abbildung 5.18: Cytochrom C Struktur

Um das Adsorptionsverhalten besser verstehen zu können, ist es hilfreich, auf röntgenkristallographische Untersuchungen zurückzugreifen. Basierend auf der in der Brookhaven Protein Databank hinterlegten Struktur von Cytochrom C (1CR1.pdb) läßt sich die Proteinstruktur visualisieren. In Abb. 5.18 ist mit Hilfe von RasMol für das Molekül das Oberflächenpotential für pH 7,0 berechnet worden (1). Neben der un-

gleichmäßigen Potentialverteilung fällt die blau eingefärbte Fläche auf, die eine stark kationische Domäne kennzeichnet. Das Stäbchen-Modell (2) zeigt die Lage des Protoporphyrin-Ringsystems, während in der unteren Struktur (3) basische Aminosäuren blau und saure rot eingefärbt sind. Aus den Ergebnissen der Soret-Banden-spektroskopischen Untersuchungen läßt sich u.a. der Winkel zwischen dem Protoporphyrin-Ring und der Glasoberfläche ermitteln. Anhand dieser Resultate lassen sich die Domänen auf der Oberfläche des Proteins ermitteln, die als Kontaktstellen an die Kapillaroberfläche binden und mit den Silanol-Gruppen in Wechselwirkung treten. Diese Vorgehensweise läßt die Vermutung zu, daß für die Wechselwirkungen nur wenige Aminosäuren in Frage kommen.

Experimente von Xu, Zhou und Regnier [126] mit Cytochrom C des Esels (*Equus asinus*) zeigen durch Chemisorption an einer Succinyl-aktivierten Oberfläche, daß nur etwa 10 Aminosäurereste aus zwei Domänen an der Adsorption beteiligt sind. Außerdem konnte kein nennenswerter Einfluß der Sorption auf die Tertiärstruktur nachgewiesen werden. Dies bestätigt auch andere Ergebnisse, bei denen Cytochrom C als Biokatalysator durch Physisorption auf Meßsonden immobilisiert wird [8]. Die Adsorption wird über die vom aktiven Zentrum abgewandte Seite vermittelt, so daß eine enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Diese Studie und auch Untersuchungen von Cuppet, et al. zeigen [127], daß neben den elektrostatischen Effekten auch die Oberflächenstruktur eine wichtige Rolle bei der Adsorption von basischen Proteinen an Quarzflächen spielt. Dies läßt sich auch dadurch begründen, daß bei Anwesenheit von Unebenheiten mehr Möglichkeiten bestehen, sowohl ionische und hydrophobe Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Glasoberfläche einzugehen. Daher kommt der Oberflächenrauigkeit der verwendeten Kapillaren große Bedeutung zu.

## 5.4 Catalase – ein Homotetramer

Die untersuchte Catalase stammt aus der Leber vom Rind (*Bos taurus*). Es handelt sich um eine Oxidoreduktase mit einem Protoporphyrin IX-Ringsystem. Die Primärstruktur umfaßt 506 Aminosäuren, wobei nur das N-terminale Ende durch Acetylierung modifiziert wird. Der IP liegt bei 6,4, die Molekularmasse beträgt 57 kDa. Die Tertiärstruktur weist keine Disulfid-Brücken auf, da die Cystein-Reste entweder isoliert in der Kernregion der Catalase liegen oder durch die tetramere Quartärstruktur von der Oberfläche ausgeschlossen werden. Unter physiologischen Bedingungen sind sie somit gegen Oxidation geschützt. Die Masse des nativ vorliegenden Homotetramers liegt bei ca. 240 kDa. Das Protein ist für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wegen dieser Merkmale ausgewählt worden, um die Einflüsse von Quartärstruktur und Molekülgröße auf die Adsorptionseigenschaften untersuchen zu können. Bei den Meßserien werden die Einwaagen und Injektionsparameter so gewählt, daß pro Lauf ca. 300 fmol ( $\approx 17$  ng) Catalase injiziert werden.

### 5.4.1 Standardmethode

#### 5.4.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0

Bei den Untersuchungen der bovinen Catalase (BLC) wird ein 50 mM Acetat-Puffer, pH 5,0 verwendet. Unter diesen Versuchsbedingungen liegt der pH-Wert ca. 1,4 Einheiten unter dem IP des Analyten. Folglich liegt das Protein in kationischer Form vor, während die Kapillarwand negativ geladen ist. Eines der Ziele besteht darin festzustellen, ob sich das Protein im Verlauf der Messungen detektieren läßt und ob Einflüsse kapillarchromatographischer Prozesse zu erkennen sind. Ein weiterer Aspekt ist die Stabilität der Quartärstruktur, woraus sich die Fragestellung ergibt, ob sich die elektrophoretischen Mobilitäten von Mono-, Di- und Tetrameren soweit unterscheiden, um diese partielle trenne zu können, vergleichbar mit den Ergebnissen von Größenausschlußchromatographischen Untersuchungen [128].

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid		4,795	4,765	4,825	0,084	1,747	0,00702
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		53,484	52,745	54,223	2,065	3,862	4,26575
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid		11,152	11,041	11,263	0,311	2,788	0,09664
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid		4,005	3,981	4,030	0,068	1,695	0,00461

Tabelle 5.4.1.1.1: System-Test, pH 5,0 (CATA-090205)

Um die notwendigen Vergleichsgrößen zu erhalten, wird zunächst die Systempräzision ermittelt, deren Ergebnisse für Acetanilid in Tab. 5.4.1.1.1 zusammengefaßt sind. Die Schwankungen des EOF liegen in diesen pH-Bereich mit ca. 1,7% RSD% für  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  aus 30 Läufen im normalen Rahmen.

In Abb. 5.19 sind verschiedene Elektropherogramme der Meßreihe zusammengefaßt. Deutlich zu erkennen sind die deutliche Zunahme der Migrationszeiten von Melamin (1) und Acetanilid (2) und das Fehlen eines Proteinpeaks.

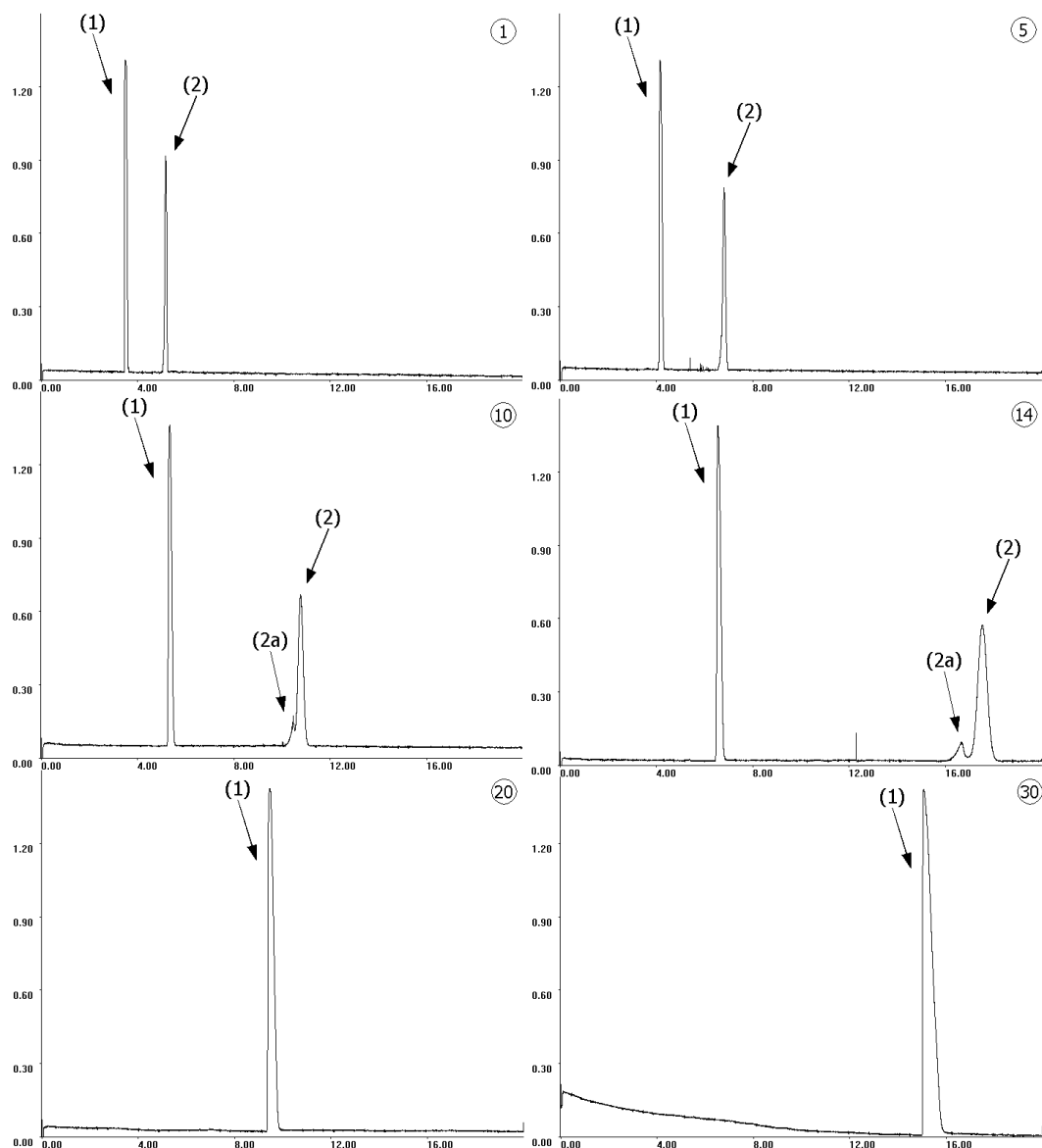


Abbildung 5.19: Catalase (~ 17 ng pro Injektion; CATA-090205)  
Acetat-Puffer pH 5,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 57 µA; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 14, 20, 30  
(1) Melamin und (2) Acetanilid

Bei dem als 2a bezeichneten Signal handelt es sich nicht um das Protein, sondern um eine nicht genauer bekannte Verunreinigung. In separaten Versuchen konnte geklärt werden, daß es sich um eine Begleitsubstanz des Acetanilids mit sehr geringer Netto-

mobilität handelt. Auffällig ist auch, daß der EOF-Marker nach dem 14. Lauf nicht mehr innerhalb des Zeitfensters von 20 min detektiert werden kann, was einer Reduktion des EOF um über 75 % innerhalb von 15 Läufen entspricht. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung des EOF-Markers sind in Tab. 5.4.1.1.2 zusammengefaßt. Auch bei den abschließenden System-Tests läßt sich Acetanilid innerhalb des Meßzeitraums von 40 min nicht mehr detektieren.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	9,467	7,448	11,487	3,855	40,720	14,86150
Fläche [AU·min]	Acetanilid	99,984	80,835	119,133	36,557	36,563	1336,41124
corr. Fläche [AU]	Acetanilid	10,776	10,318	11,233	0,873	8,099	0,76156
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	2,333	1,886	2,780	0,853	36,571	0,72810

Tabelle 5.4.1.1.2: Catalase, pH 5,0 EOF-Marker (CATA-090205)

Aus der Beobachtung, daß die Migrationszeiten des internen Standards Melamin in der zweiten Kontrollserie konstant bei 15,38 min liegen (RSD%= 0,23%; Abb. 5.19), können zwei Rückschlüsse gezogen werden. Erstens kann angenommen werden, daß im Verlauf der zweiten Kontrollserie keine nennenswerten Desorptionsprozesse ablaufen, die zu einer teilweisen Regeneration der Kapillaroberfläche führen (vgl. Kap 1.4). Zweitens läßt sich und mit Hilfe von Gl. 12 und Gl. 22, basierend auf den Werten des System-Tests,  $\mu_{\text{EOF}}$  mit  $\sim -0,5 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  abschätzen. Folglich hat sich das Potential der Kapillaroberfläche durch die Adsorption der Catalase umgekehrt. Unterstellt man eine gleichförmige Adsorption der Oberfläche, kann man davon ausgehen, daß sich um den 23. Lauf der EOF umkehrt und folglich auch das Oberflächenpotential. Dadurch nimmt wahrscheinlich auch die Proteinadsorption aufgrund gleichnamiger Ladungen deutlich ab. Die Migrationszeiten des internen Standards stabilisieren sich, sobald die Untersuchung der Catalase beendet wird. Berücksichtigt man zusätzlich das Taylor-Aris-Dispersionsmodell (vgl. 5.1.3.3), muß angenommen werden, daß sich

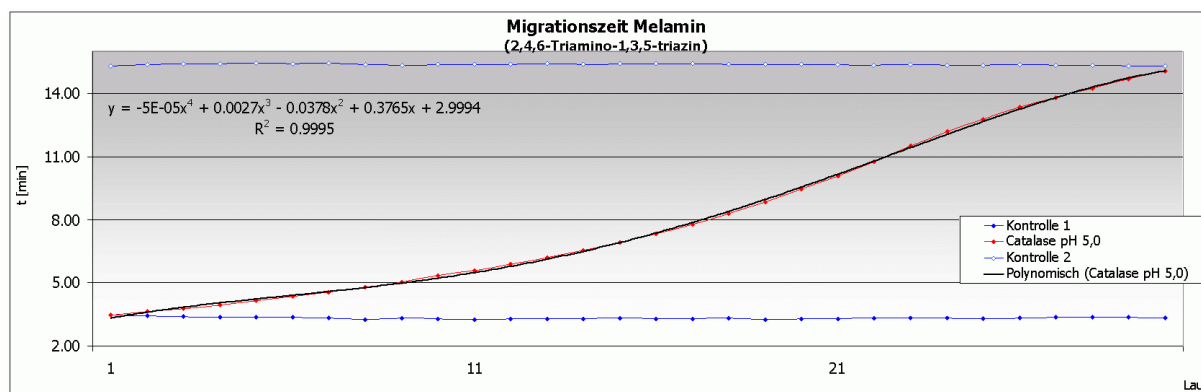


Abbildung 5.20: Migrationszeiten interner Standard, Catalase pH 5,0

am Verhältnis von nativer Kapillaroberfläche zur Fläche, die durch Proteinablagerungen bedeckt ist, sich nichts verändert. Das bedeutet auch, daß die Denaturierung der Catalase bei pH 5,0 bereits während der Untersuchungen abgeschlossen ist, da im Verlauf der nachfolgenden 20 Stunden keine Alterungsprozesse der Proteinplaques und dadurch bedingt, keine Änderungen der Migrationszeiten beobachten lassen.

#### 5.4.1.2 Untersuchungen bei pH 5,5

Die Voraussetzungen der Untersuchungen bei pH 5,5 sind ähnlich zu der vorausgegangenen Meßreihe. Auch hier wird zunächst die Systempräzision vor der eigentlichen Untersuchung ermittelt. Verwendet wird ein 50 mM Acetat-Puffer. Die elektroosmotische Mobilität liegt bei  $4,282 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  und schwankt gleichmäßig um 2,14% (Tab. 5.4.1.2.1).

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,485	4,451	4,520	0,096	2,142	0,0092
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	58,624	58,290	58,958	0,933	1,591	0,8705
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	13,076	12,943	13,210	0,373	2,853	0,1392
EOF	$[10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$	Acetanilid	4,282	4,250	4,315	0,092	2,138	0,0084

Tabelle 5.4.1.2.1: System-Test, pH 5,5 EOF-Marker (CATA-210205)

Auch unter den Bedingungen bei pH 5,5 erkennt man während der gesamten Meßreihe eine deutliche Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) (Abb. 5.21). Erneut gerät der EOF-Marker aus dem 20minütigen Zeitfenster, bedingt durch die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität. Allerdings tritt dieses Problem erst nach dem 23. Lauf auf. Die Verunreinigung aus dem Acetanilid wird auch bei dieser Untersuchungsreihe detektiert, bedingt durch die Abnahme des EOF. Bei pH 5,5 lassen sich in den Elektropherogrammen keine Peaks der Catalase zuordnen. Dafür treten bei allen relevanten Größen ( $t_{\text{Mig}}$ , AU, korr. AU) massive, eindeutig Trend behaftete Schwankungen auf, die durch die Adsorption des Proteins an der Kapillaroberfläche ausgelöst werden. Vergleicht man die statistische Auswertung (Tab. 5.4.1.2.2) für den EOF-Marker mit den Werten der Untersuchung bei pH 5,0 (Tab. 5.4.1.1.2), ergeben sich sehr ähnliche Werte. Man muß jedoch berücksichtigen, daß diese RSD%-Werte bei pH 5,5 aus 23 Läufen erhoben werden im Vergleich zu 13 Werten bei pH 5,0. Die Beeinträchtigungen sind insgesamt nicht so stark ausgeprägt wie bei pH 5,0.

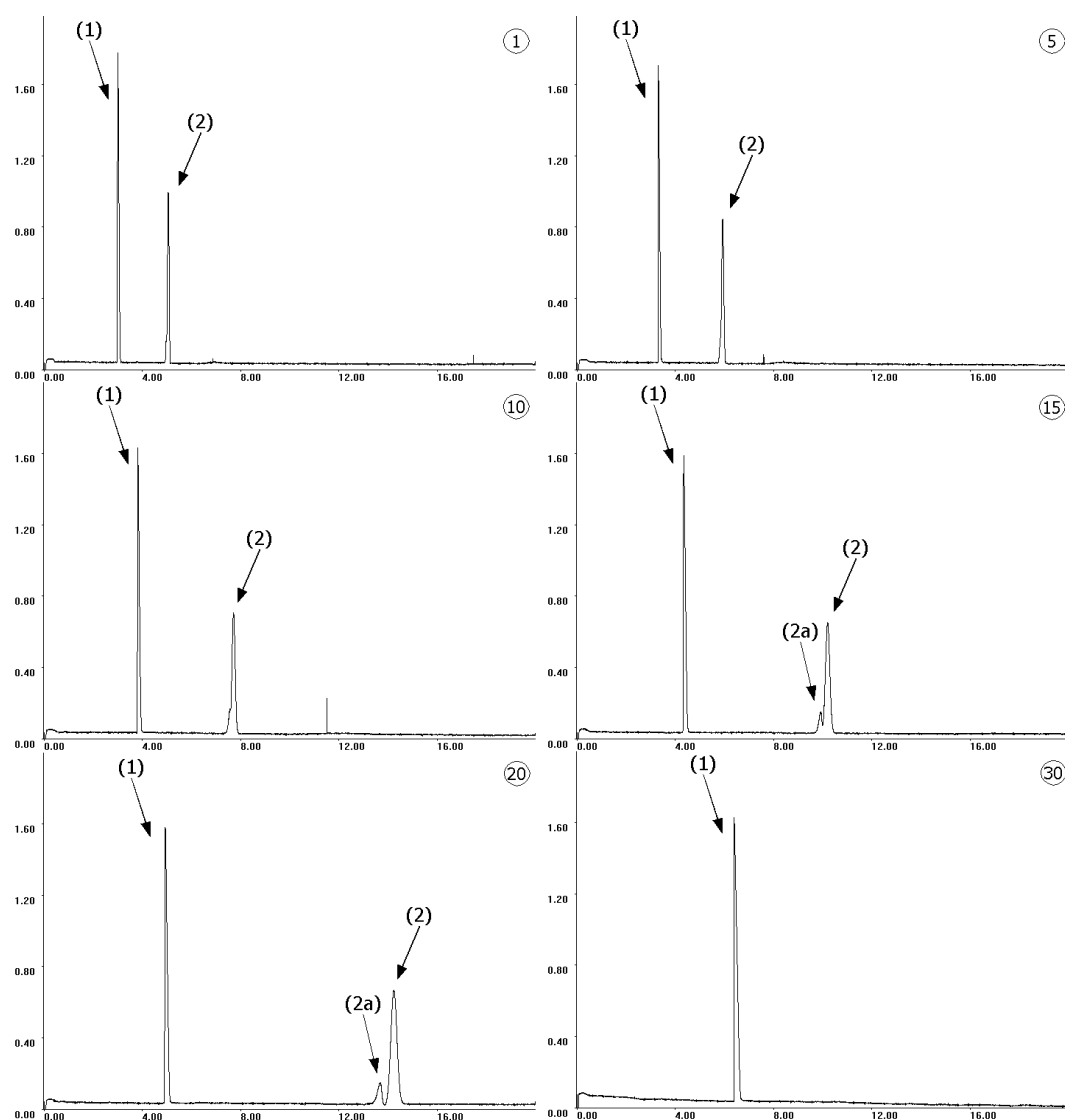


Abbildung 5.21: Catalase ( $\sim 16$  ng pro Injektion; CATA-210205)  
 Acetat-Puffer pH 5,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 62 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin und (2) Acetanilid

Da der EOF-Marker auch in den abschließenden Kontrollversuchen nicht detektiert wird, läßt sich das Ausmaß der Proteinadsorption nur durch den Vergleich der Migrationszeiten des internen Standards in den einzelnen Abschnitten abschätzen. Unter Annahme eines konstanten Wertes von  $\mu_{\text{eff}}$  (Neostigmin) =  $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  errechnet sich für  $\mu_{\text{EOF}}$  ein ungefährender Wert von  $\sim 0,37 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Beobachtung, daß der EOF um ca. 90% abnimmt, aber nicht umgekehrt wird, läßt sich auf zwei Vorgänge zurückführen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\sigma}$	RSD %	$\bar{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	9,568	7,948	11,187	3,962	41,411	15,6979
Fläche [AU·min]	Acetanilid	92,635	77,256	108,014	37,631	40,623	1416,0853
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	9,846	9,353	10,338	1,205	12,243	1,4530
EOF [ $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	Acetanilid	2,329	1,973	2,686	0,872	37,436	0,7604

Tabelle 5.4.1.2.2: Catalase, pH 5,5 EOF-Marker (CATA-210205)



Zunächst ist die Tendenz der Catalase bei pH 5,5 zu adsorbieren geringer, weil die Nettoladung der Moleküle kleiner ist als bei pH 5,0. Zusätzlich wird das Oberflächenpotential der Kapillare im Bereich der Proteinplaques weniger stark verändert, da die Ladung der Adsorbate insgesamt geringer ist.

#### 5.4.1.3 Untersuchungen bei pH 6,0

Bei den Untersuchungen bei pH 6,0 wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. Die Untersuchungen bei diesem pH-Wert knapp unterhalb des theoretischen IP der bovinen Catalase sollen Aufschluß darüber geben, ob es zur Überlagerung von zonen-elektrophoretischen und kapillar-chromatographischen Prozessen kommt, vergleichbar mit den Beobachtungen von Cytochrom C bei pH 9,2 (Kap. 5.3.3). Die Ergebnisse der einleitenden Kontrollserie sind in Tab. 5.4.1.3.1 zusammengefaßt.

Bei der Beurteilung muß berücksichtigt werden, daß die relativ hohe Streuung der Migrationszeiten des EOF-Markers auf die verzögerte Einstellung des Oberflächenpotentials bei pH 6,0 zurückzuführen ist. Berücksichtigt man die ersten 10 der insgesamt 30 Läufe nicht für die Auswertung, reduziert sich die Streuung der Meßwerte auf unter 1,8%, so daß ein äquilibriertes System vorliegt.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,832	4,654	5,010	0,498	10,298	0,24763
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	38,881	37,921	39,841	2,683	6,900	7,19677
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,075	7,935	8,215	0,392	4,850	0,15337
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,007	3,886	4,128	0,338	8,437	0,11426

Tabelle 5.4.1.3.1: System-Test, pH 6,0 EOF-Marker (CATA-141204)

In Abb. 5.22 sind die Veränderungen der Elektropherogramme innerhalb der Proteinuntersuchung exemplarisch zusammengefaßt. Neben einer Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) lassen sich weitere Feststellungen treffen. Zunächst ist das Auftreten eines Protein-Peaks (3) hervorzuheben, dessen scheinbare Mobilität  $\mu_{\text{app}}$  geringer ist als jene des EOF-Markers. Dies ist nicht zwangsläufig auf eine negative Nettoladung zurückzuführen. Unterstellt man partiell reversible Verteilungsprozesse zwischen Puffer und Kapillaroberfläche, so läßt sich die verminderte Migrationsgeschwindigkeit erklären. Diese Annahme läßt sich dadurch stützen, daß die elektroosmotische Mobilität während der Proteinuntersuchung abnimmt und bei den abschließenden Kontrollversuchen der EOF um über 20% wieder zunimmt. Eine interessante Beobachtung ist, daß sich die Peakform der Catalase konti-

nuerlich ändert. Bei den ersten Elektropherogrammen noch ein Tailing zu erkennen ist, werden die Catalase-Peaks zunehmend symmetrischer. Gegen Ende der Meßreihe lassen sich keine genauen Aussagen über die Geometrie mehr treffen, weil der Peak am Rand des Zeitfensters liegt und flach ist. Darüber hinaus treten immer wieder unregelmäßige Spikes in den Elektropherogrammen auf, die ein Indiz für Proteinagglomerate sind, die sich von der Kapillaroberfläche lösen.

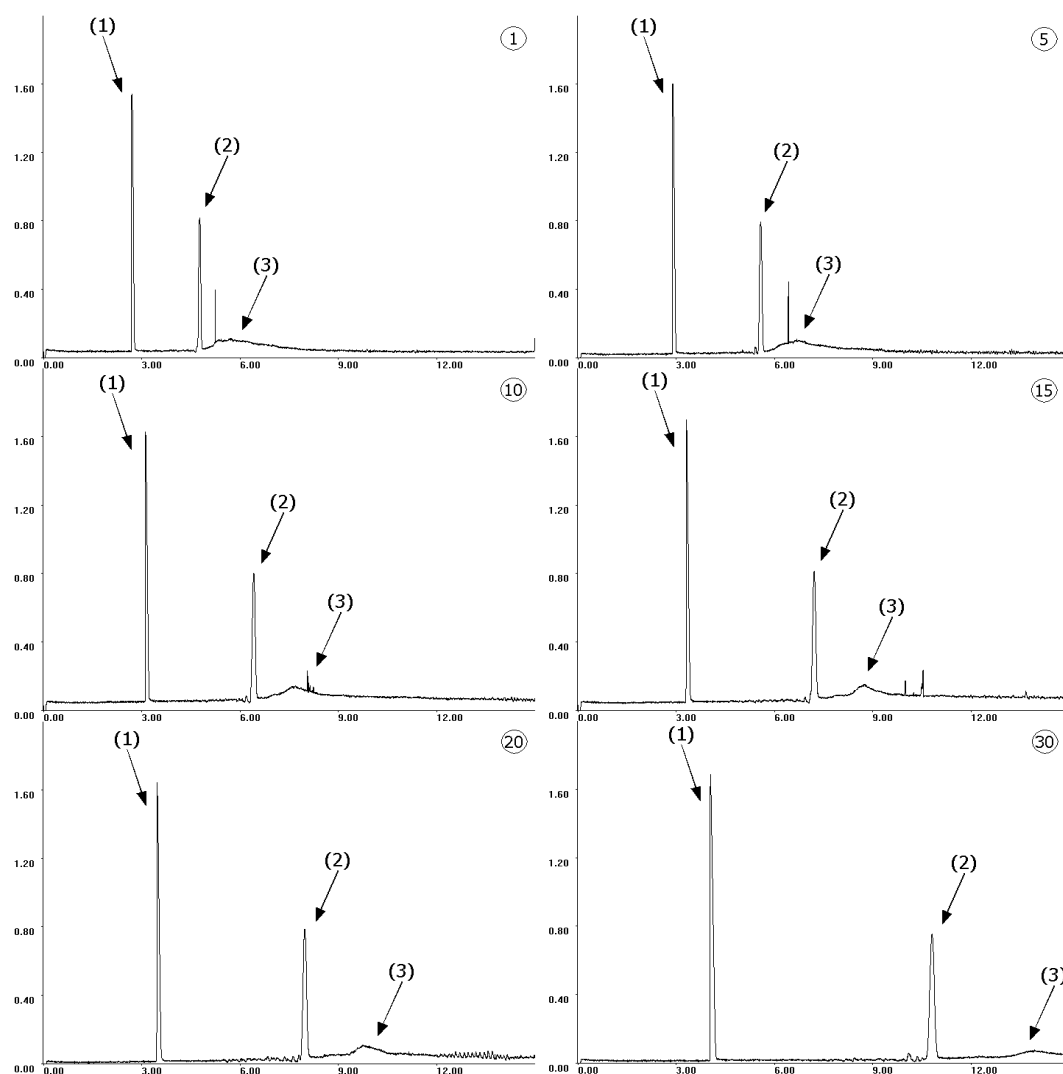


Abbildung 5.22: Catalase ( $\sim 16$  ng pro Injektion; CATA-141204)  
 Acetat-Puffer pH 6,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 54 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Vergleicht man die Resultate der statistischen Auswertung (Tab. 5.4.1.3.2), fällt auf, daß die korrigierten Peakflächen der Vergleichssubstanzen mit ca. 4% deutlich geringer streuen als jene der Catalase. Die Gründe für die signifikante Abnahme sind darin zu sehen, daß der Protein-Peak gegen Ende der Messungen nicht mehr vollständig detektiert wird und wegen der geringen Peakhöhe mit Integrationsfehlern behaftet ist.

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	7,333	6,772	7,894	1,568	21,388	2,45994
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	62,230	58,222	66,238	11,200	17,997	125,43741
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,544	8,425	8,663	0,333	3,892	0,11060
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	2,738	2,525	2,952	0,596	21,780	0,35568
t <sub>Mig</sub>	[min]	Catalase	9,113	8,320	9,906	2,217	24,329	4,91554
Fläche	[AU·min]	Catalase	42,804	36,456	49,151	17,738	41,441	314,65273
korr. Fläche	[AU]	Catalase	5,459	4,255	6,664	3,367	61,674	11,33679

Tabelle 5.4.1.3.2: Catalase pH 6,0, Ergebnisse Acetanilid und Protein (CATA-141204)

#### 5.4.1.4 Untersuchungen bei pH 6,5

Die Untersuchungen bei pH 6,5 sollen darüber Aufschluß geben, ob sich die Ergebnisse durch die geringfügige Änderung des pH-Wertes im Bereich des IP deutlich verändern. Die Konzentration des Phosphat-Puffers beträgt 50 mM, alle anderen Versuchsparameter bleiben unverändert. Im Vergleich zum System-Test bei pH 6,0 streuen die Werte insgesamt weniger (vgl. Tab. 5.4.1.3.1 bzw. Tab. 5.4.1.4.1).

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	3,989	3,971	4,008	0,052	1,296	0,00267
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	80,971	79,915	82,028	2,954	3,648	8,72328
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	20,292	20,105	20,479	0,522	2,573	0,27253
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,814	4,791	4,836	0,062	1,286	0,00383

Tabelle 5.4.1.4.1: System-Test, pH 6,5 EOF-Marker (CATA-040505)

Vergleicht man die einzelnen Elektropherogramme der Catalase-Meßreihe miteinander (Abb. 5.23), fällt auf, daß die Migrationszeiten von internem Standard (1) und EOF-Marker (2) auch bei pH 6,5 zunehmen. Die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität um 30% fällt jedoch geringer aus als bei pH 6,0 (ca. 58%). Die Peakform der Catalase (3) verändert sich nicht so stark wie bei der vorausgegangenen Meßreihe. Die wichtigsten Ergebnisse der statistischen Auswertung sind nachfolgend in Tab. 5.4.1.4.2 zusammengefaßt.

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	5,064	4,893	5,235	0,478	9,447	0,22886
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	98,058	94,872	101,244	8,904	9,080	79,28008
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	19,375	19,201	19,549	0,486	2,509	0,23627
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,826	3,692	3,959	0,373	9,757	0,13932
t <sub>Mig</sub>	[min]	Catalase	6,337	6,058	6,617	0,781	12,321	0,60966
Fläche	[AU·min]	Catalase	66,632	64,939	68,324	4,730	7,099	22,37360
korr. Fläche	[AU]	Catalase	10,687	10,106	11,267	1,622	15,176	2,63005

Tabelle 5.4.1.4.2: Catalase pH 6,5, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-040505)

Gegenüber den Werten bei pH 6,0 streuen die Meßresultate für das Protein weniger deutlich. Man beobachtet allerdings bei der korr. Peakfläche, als zeitunabhängiger

Größe, eine Abnahme innerhalb der Meßreihe. Während sich bei Neostigmin und Acetanilid die Peaks nicht wesentlich verbreitern, ist dies bei der Catalase der Fall. Dieser Umstand weist auf Integrationsprobleme als Fehlerquelle hin, die sich jedoch nicht vermeiden lassen, da die langgestreckte Peakform eine korrekte Bestimmung der Peakgrenzen verhindert. Bei dem abschließenden System-Test beträgt die RSD% der elektroosmotischen Mobilität 1,96%. Die Schwankungen sind nicht signifikant größer als vor der Untersuchung des Proteins, allerdings läßt sich im Vergleich zur einleitenden Kontrollserie eine klare Reduktion des EOF um ca. 20% verzeichnen.

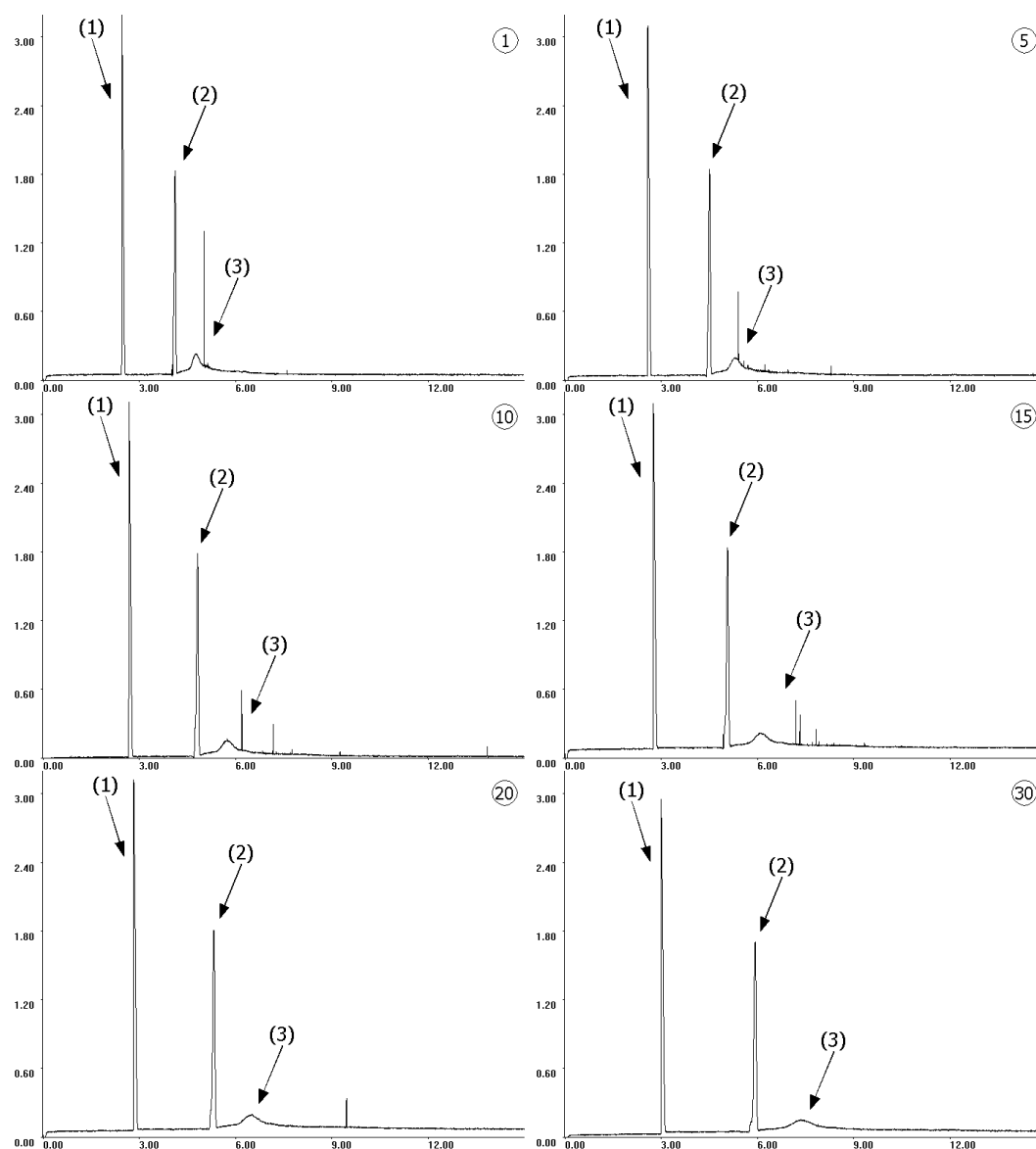


Abbildung 5.23: Catalase (~ 15 ng pro Injektion; CATA-040505)  
 Phosphat-Puffer pH 6,5, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 68 µA; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

### 5.4.1.5 Untersuchungen bei pH 7,0

Da im Bereich zwischen pH 5,0 und 6,5 keine verlässliche Analytik der BLC möglich ist, wird das kapillarelektrophoretische Verhalten des Proteins bei pH 7,0 untersucht. Für die Untersuchungen wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. Die Ergebnisse des obligatorischen System-Tests sind für Acetanilid in Tab. 5.4.1.5.1 aufgelistet. Bis auf die Fläche (RSD%=1,9%) schwanken alle relevanten Parameter um etwa 1,5%.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,055	3,039	3,072	0,047	1,525	0,00217
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	24,470	24,303	24,637	0,468	1,912	0,21885
corr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,009	7,968	8,050	0,114	1,427	0,01306
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	6,285	6,251	6,319	0,094	1,498	0,00887

Tabelle 5.4.1.5.1: System-Test, pH 7,0 EOF-Marker (CATA-011104)

Bei der anschließenden Untersuchung der Catalase zeigt sich ein stark verändertes Bild (Abb. 5.24) im Vergleich zu den Versuchen bei niedrigeren pH-Werten. Zum einen streuen die Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) deutlich weniger als bei den bisherigen Versuchsreihen. Zum anderen ist die Peakfläche des Proteins (3) trotz vergleichbarer Substanzmenge deutlich größer. Vergleicht man die korrigierten Peakflächen der Serien bei pH 6,5 und 7,0 miteinander, ergibt sich eine Zunahme von über 150%. Weitaus bedeutsamer ist aber die Tatsache, daß die Peakform bisher nicht beobachtete Merkmale aufweist. Mit Ausnahme des ersten Laufes treten bei allen weiteren Elektropherogrammen zwei Maxima (3a und 3b) auf. Der Anteil der beiden Proteinfractionen verschiebt sich offenbar von Lauf zu Lauf, wobei keine eindeutige Tendenz zu erkennen ist. Eine weitere Schwierigkeit, welche bei der Auswertung auftritt, ist die teilweise deutliche Überlagerung (Lauf 10) des Proteinsignals mit dem EOF-Marker-Peak. Daher ist es nicht verwunderlich, daß in der Folge auch die Werte für die Peakflächen streuen.

Experiment Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,534	3,460	3,608	0,207	5,865	0,04296
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	26,209	25,012	27,407	3,347	12,772	11,20543
corr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,407	7,136	7,678	0,757	10,216	0,57254
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,451	5,334	5,568	0,326	5,987	0,10651
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Catalase	4,998	4,817	5,179	0,506	10,119	0,25576
Fläche	[AU·min]	Catalase	118,860	102,081	135,640	46,891	39,450	2198,73355
corr. Fläche	[AU]	Catalase	39,849	34,678	45,021	14,452	36,267	208,86990

Tabelle 5.4.1.5.2: Catalase pH 7,0, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-011104)

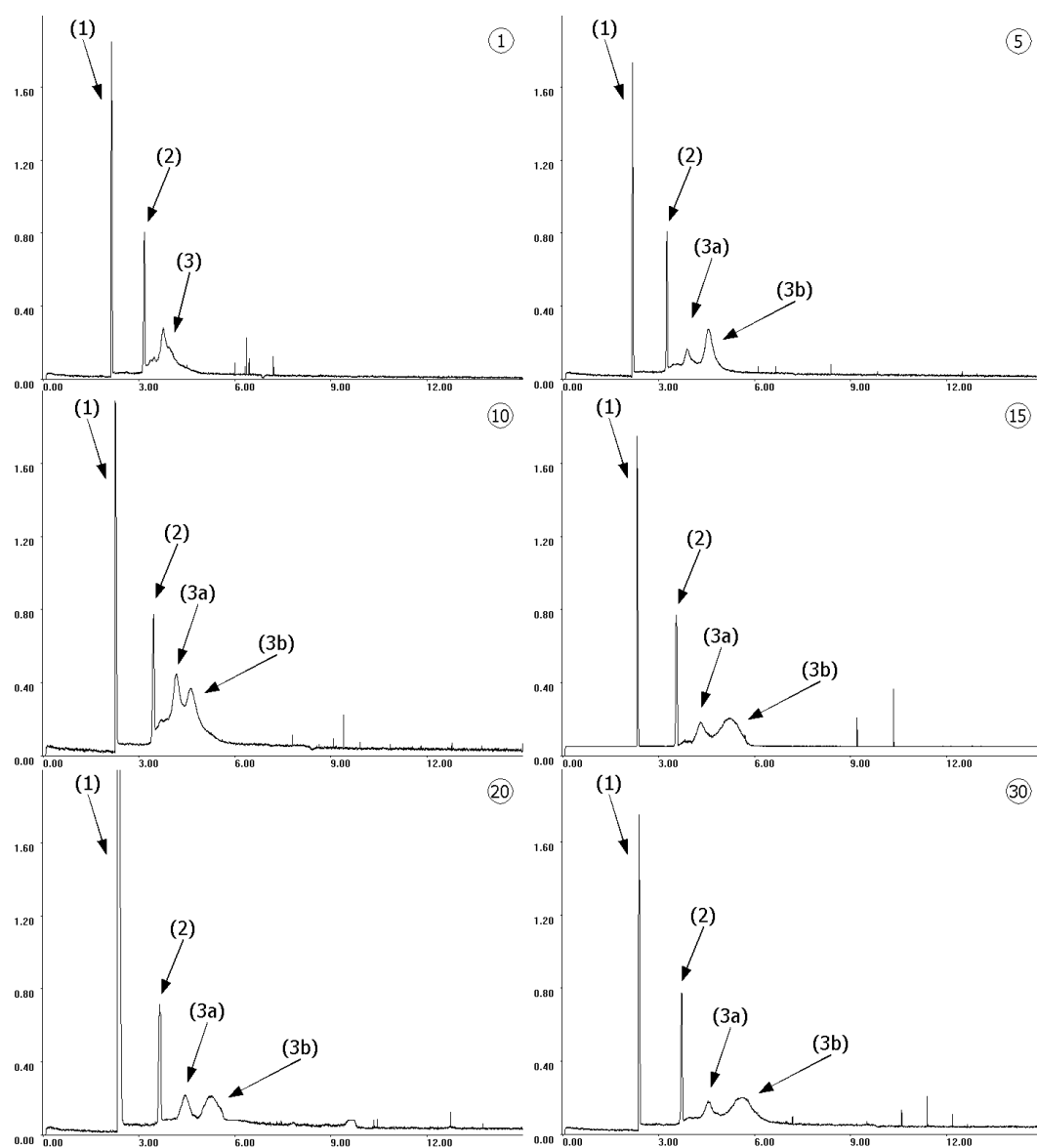


Abbildung 5.24: Catalase ( $\sim 17$  ng pro Injektion; CATA-011104)  
Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 93 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Unerwartet ist hingegen, daß die Werte für die korrigierten Peakflächen von Acetanilid mit 10,2% deutlich geringere Schwankungen aufweisen als die entsprechenden Werte für Neostigmin ( $\sim 64\%$ ; vgl. Kap. 9.1.5) und Catalase (ca. 36%).

### 5.4.1.6 Untersuchungen bei pH 8,0

Die Voraussetzungen für die Untersuchungen der Catalase sind im Vergleich zu pH 7,0 bei pH 8,0 günstiger. Der pH-Wert liegt ca. 1,6 Einheiten oberhalb des IP. Daher sind sowohl das Protein als auch die Kapillaroberfläche negativ geladen. Zusätzlich ist die Ionenstärke des 50 mM Phosphat-Puffers wesentlich höher, so daß das Oberflächenpotential der Kapillare besser abgeschirmt wird (vgl. Kap. 1.4.4). Somit sollten

mögliche Adsorptionsprobleme zurückgedrängt werden. Die Ergebnisse für die Systempräzision sind in Tab. 5.4.1.6.1 aufgelistet.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\sigma}$	RSD %	$\bar{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	2,595	2,592	2,598	0,009	0,00008
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	19,737	19,593	19,882	0,404	0,16300
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	7,606	7,552	7,660	0,150	0,02243
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	7,399	7,390	7,408	0,026	0,00066

Tabelle 5.4.1.6.1: System-Test, pH 8,0 EOF-Marker (CATA-021104)

In Abb. 5.25 sind verschiedene Elektropherogramme der Meßreihe bei pH 8,0 zusammengefaßt. Im direkten Vergleich mit den entsprechenden Läufen bei pH 7,0 fällt auf, daß die Peakform wesentlich besser reproduzierbar ist und nur noch ein Peak-Maximum vorliegt. Dennoch ist ein Fronting der Catalase (3) zu erkennen, so daß das Signal des EOF-Markers (2) auf der linken Flanke des Protein-Peaks aufsitzt und beide Analyten nicht Basislinien-getrennt vorliegen.

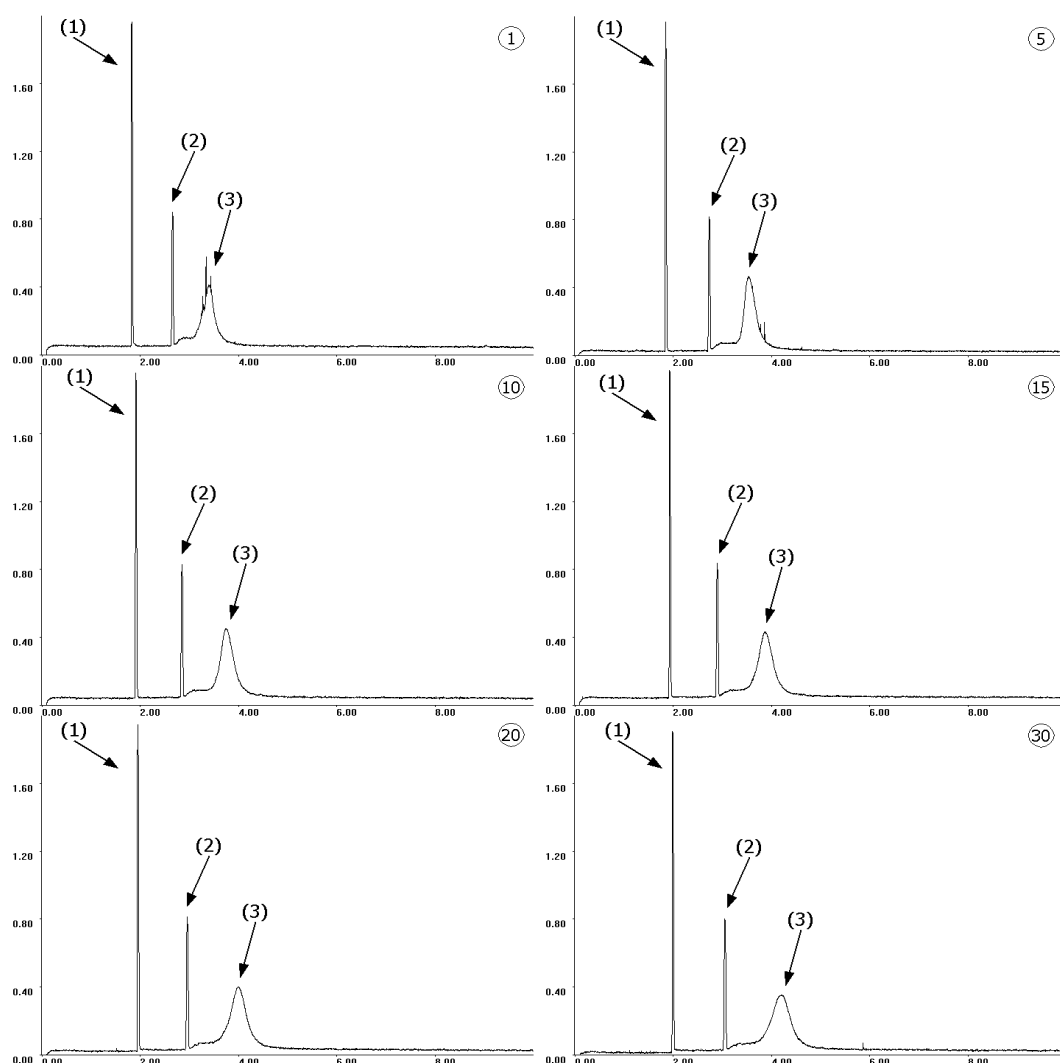


Abbildung 5.25: Catalase (~ 17 ng pro Injektion; CATA-011104)  
Phosphat-Puffer pH 7,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 93 µA; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Beim Vergleich der Migrationszeiten stellt man fest, daß die Werte, auch von Neostigmin (1), zunehmen. Die Abnahme des EOF wirkt sich bei den korr. Peakflächen weniger stark aus als bei den absoluten (vgl. Tab 5.4.6.1.2), so daß die RSD% lediglich 0,95% (Neostigmin) bzw. 1,42% (Acetanilid) betragen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	2,892	2,851	2,932	0,114	3,929	0,01291
Fläche [AU·min]	Acetanilid	21,378	21,049	21,707	0,919	4,300	0,84516
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,392	7,355	7,430	0,105	1,421	0,01104
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,650	6,554	6,745	0,266	4,005	0,07091
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Catalase	3,854	3,767	3,941	0,243	6,297	0,05890
Fläche [AU·min]	Catalase	107,275	103,881	110,669	9,485	8,842	89,97008
korr. Fläche [AU]	Catalase	27,796	27,454	28,139	0,957	3,442	0,91540

Tabelle 5.4.1.6.2: Catalase pH 8,0, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-021104)

Die Verwendung des Quotienten der korr. Flächen bringt im Fall der Catalase jedoch keine Verbesserung im Vergleich zur RSD% der absoluten korr. AU. Bei eingehender Betrachtung der Meßwerte fällt auf, daß die Peakfläche im ersten Lauf der Meßreihe signifikant kleiner ist. Berücksichtigt man nur die Läufe 2-30 für die Auswertung, reduziert sich die RSD% auf 2,25%. Für die Interpretation der Meßergebnisse muß die abschließende Untersuchung der Systempräzision berücksichtigt werden, in deren Verlauf der EOF um 6,5% zunimmt. Die Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, daß auch bei pH 8,0 das Protein an der Kieselglasoberfläche adsorbiert. Dies erfolgt aber in so geringem Maß, daß die Wiederholpräzision deutlich weniger beeinträchtigt wird als in den bisherigen Untersuchungen bei niedrigeren pH-Werten.

#### 5.4.1.7 Untersuchungen bei pH 9,2

Aufgrund der bisher erhaltenen Resultate soll geklärt werden, ob sich die Wiederholpräzision durch die Verwendung eines 100 mM Borat-Puffer bei pH 9,2 bei der Proteinuntersuchung weiter verbessern läßt.

Routinemäßig wird vor der eigentlichen Untersuchung des Proteins ein System-Test durchgeführt. Die Ergebnisse für den EOF-Marker sind in Tab. 5.4.1.7.1 wiedergegeben, wobei diese geringfügig schlechter sind als jene des internen Standards (vgl. 9.1.7). Obwohl unter den Versuchsbedingungen die Ionenstärke geringerer und die Oberfläche stärker ionisiert vorliegt als bei pH 8,0, ist die elektroosmotische Mobilität signifikant niedriger. Diese zunächst paradoxe Beobachtung läßt sich dadurch erklären, daß die höhere spezifische Leitfähigkeit des Phosphat-Puffers zu einer stärkeren



Wärmefreisetzung führt. Damit verbunden nehmen bei pH 8,0 die Viskosität ab und der EOF scheinbar zu.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\sigma}$	RSD %	$\bar{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	3,152	3,150	3,154	0,005	0,00002
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	25,597	25,436	25,758	0,450	0,20212
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	8,122	8,069	8,174	0,146	0,02135
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	6,092	6,088	6,095	0,009	0,00009

Tabelle 5.4.1.7.1: System-Test, pH 9,2 EOF-Marker (CATA-051104)

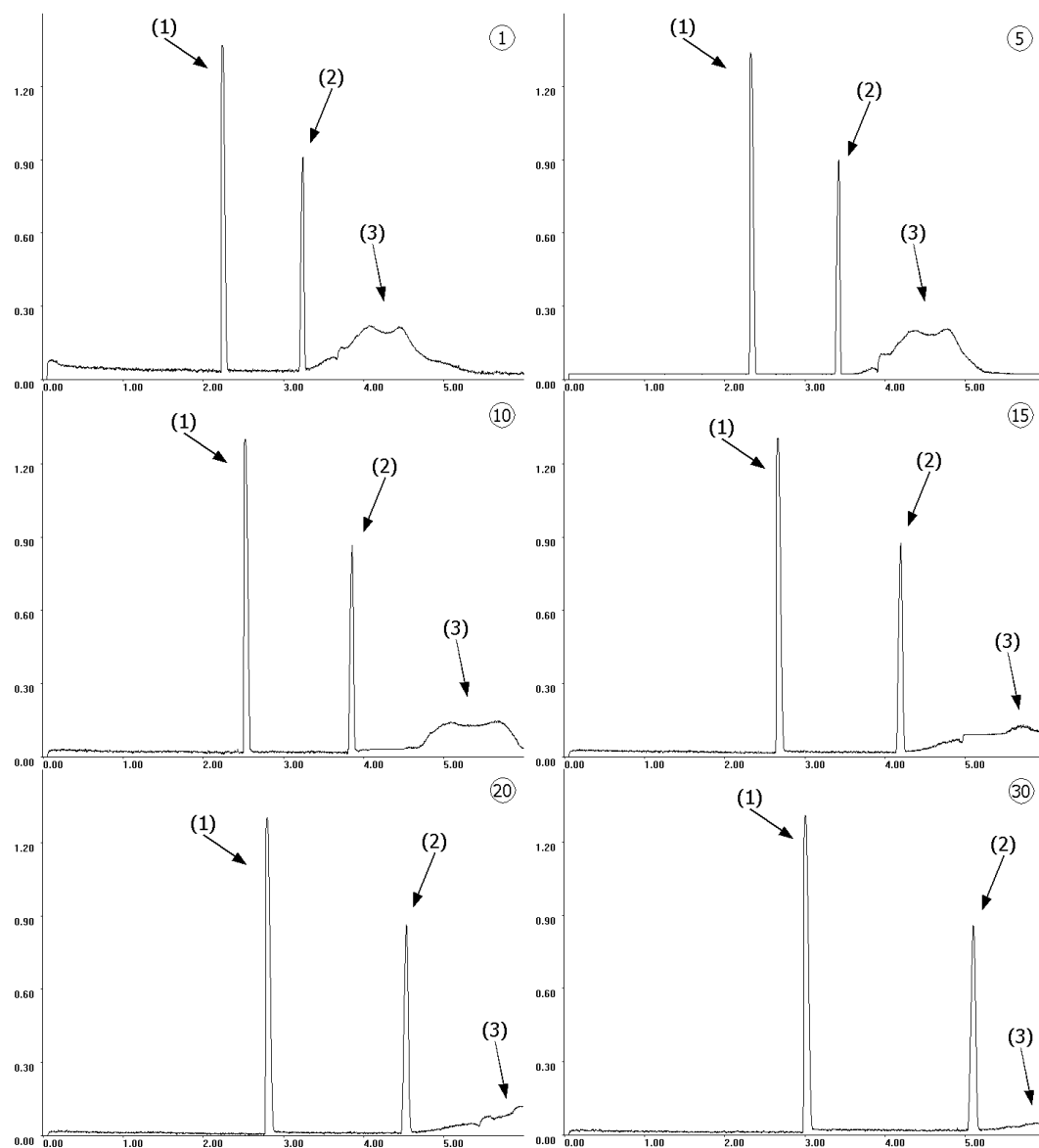


Abbildung 5.26: Catalase (~ 18 ng pro Injektion; CATA-051104)  
Borat-Puffer pH 9,2, 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 37 µA; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

In Abb. 5.26 sind einige Elektropherogramme zusammengefaßt, welche die beobachteten Phänomene illustrieren. Zu den unerwarteten Resultaten gehört die massive Zunahme der Migrationszeiten aller Analysenbestandteile, selbst der des internen Standards (1), bei dem die Zunahme etwa 33% beträgt. Außerdem fällt die deutlich

veränderte Peakform der Catalase (3) auf. Liefert bei pH 8,0 die Hauptfraktion des Proteins noch einen symmetrischen Peak, so lassen sich jetzt zwei Peak-Maxima beobachten. Diese lassen sich vermutlich auf zwei überlappenden Peaks verschiedener Fraktionen zurückführen. Im Verlauf der Untersuchungen nimmt die Peakbreite immer mehr zu, wobei der Protein-Peak ab dem 10. Lauf teilweise außerhalb des gewählten Zeitfensters liegt. Außerdem läßt sich beobachten, daß die Probenzone des EOF-Markers (2) direkt auf der linken Flanke des Catalase-Peaks aufsetzt. Da die Schwankungen der Migrationszeiten zwischen 8,9 und 13,6% RSD% liegen, muß für die Auswertung auf die korrigierten Peakflächen zurückgegriffen werden.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,237	4,031	4,444	0,568	13,409	0,32286
Fläche [AU·min]	Acetanilid	34,151	32,520	35,782	4,481	13,121	20,07935
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	8,066	7,982	8,150	0,231	2,867	0,05347
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,614	4,379	4,848	0,644	13,953	0,41444
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Catalase	4,992	4,619	5,365	0,601	12,041	0,36130
Fläche [AU·min]	Catalase	93,246	72,576	113,917	33,351	35,766	1112,27722
korr. Fläche [AU]	Catalase	19,639	14,074	25,204	8,979	45,721	80,62361

Tabelle 5.4.1.7.2: Catalase pH 9,2, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-051104)

Diese variieren für die Vergleichssubstanzen um 2,04% (1) bzw. 2,87% (2), während die Werte für das Protein infolge kontinuierlicher Abnahme von AU und korr. AU um ein Vielfaches streuen (vgl. Tab. 5.4.1.7.2). Bei den abschließenden Kontrollversuchen ( $n=30$ ) verändern sich weder die Migrationszeiten von Neostigmin und Acetanilid ( $\text{RSD\%} < 1,2\%$ ) noch die Peakflächen ( $\text{RSD\%} < 2,0\%$ ) nennenswert. Daher muß unter diesen Bedingungen von einer irreversiblen Adsorption des Proteins ausgegangen werden, obwohl der pH-Wert deutlich oberhalb des IP liegt.

#### 5.4.1.8 Diskussion der Teilergebnisse

Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen der Catalase zeigen deutlich die Abhängigkeit des Adsorptionsverhaltens vom pH-Wert des verwendeten Puffers. Der IP des Enzyms liegt bei etwa 6,4. Bei den Untersuchungen, bei denen der pH-Wert über eine Einheit unterhalb dieses Wertes liegt, läßt sich das Protein nicht detektieren. Vielmehr beobachtet man eine massive Abnahme des EOF, wobei sich dessen Vorzeichen im Fall der Untersuchungen bei pH 5,0 sogar umkehrt. Diese Meßreihe zeigt, daß die Verwendung eines internen Standards mit ausreichend hoher Nettomobilität zur Aufklärung der ablaufenden Prozesse beiträgt.

Die Versuchsreihen bei pH-Werten, die in der Nähe des IP liegen, zeigen die Komplexität der parallel ablaufenden Prozesse auf. So läßt sich bei pH 6,0 das Biopolymer in den Elektropherogrammen reproduzierbar detektieren, allerdings unterliegen die Migrationszeiten einem deutlichen Trend (vgl. Abb. 5.27). Darüber hinaus stimmt die theoretisch zu erwartende Migrationsreihenfolge nicht mit der beobachteten überein. Wie auch bei den Untersuchungen von Cytochrom C (Kap. 5.3.3) zeigt sich, daß sich in dem Bereich um den IP des Analyten elektrophoretische und chromatographische Vorgänge überlagern und dadurch die Resultate nachhaltig beeinflussen. Eine weitere Erkenntnis, die aus den Meßreihen zwischen pH 6,0 und 7,0 gewonnen werden kann, ist der Umstand, daß die immensen Schwankungen bei den korrigierten Peakflächen des Proteins nicht nur durch fortlaufende Adsorption an der Kapillaroberfläche hervorgerufen werden, sondern daß auch die Integration als eine mögliche Fehlerquelle berücksichtigt werden muß.

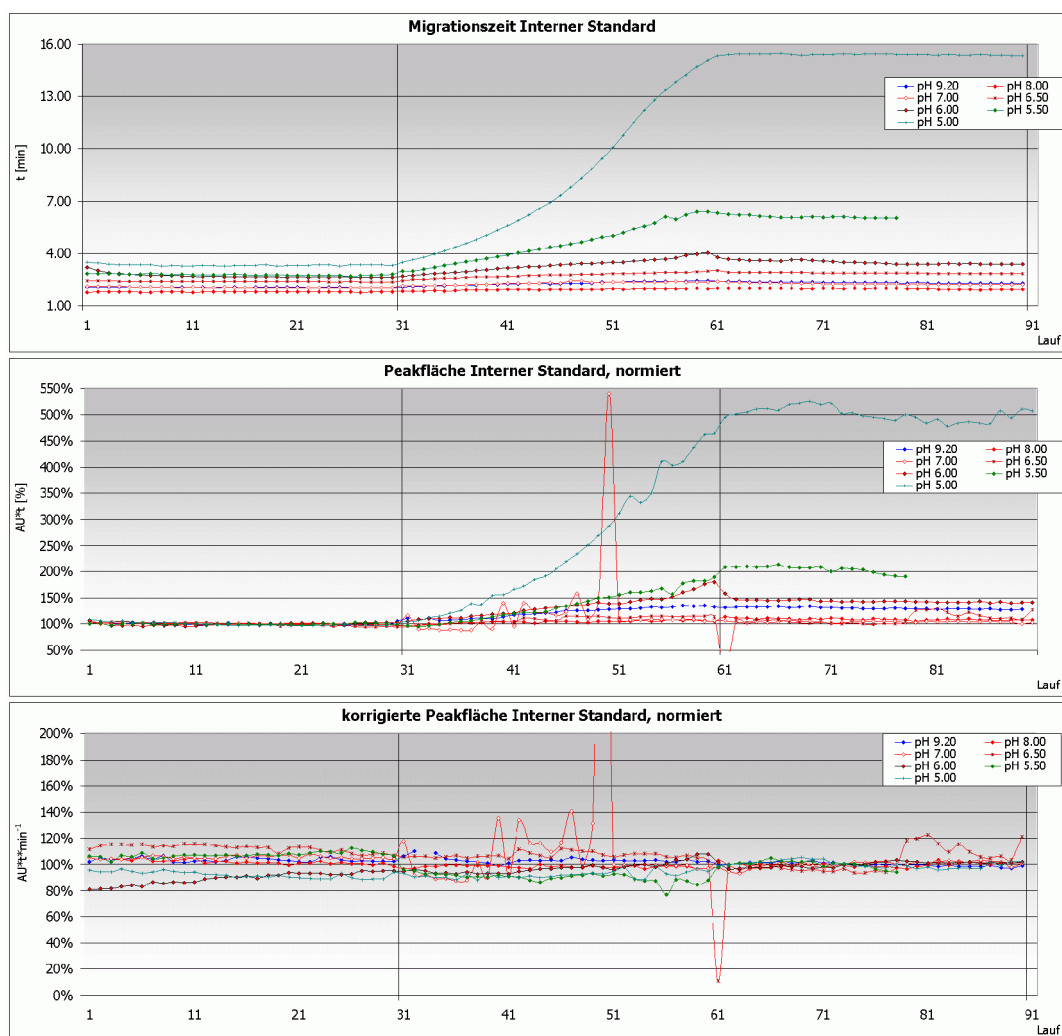


Abbildung 5.27: Catalase; Ergebnisse interner Standard pH 5,0 - 9,2

Dies trifft in besonderem Maß zu, wenn es sich um relativ langgezogene, flache Peaks handelt wie im Fall der Catalase. Bereits kleine Schwankungen bei der Peakgrenzen-Bestimmung führen zu großen Abweichungen der Peakfläche.

Ein weiterer Effekt, der bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muß, ist die Bedeutung der relativen korrigierten Peakflächen. Bei den durchgeführten Untersuchungen ist darauf Wert gelegt worden, daß die Zusammensetzung der Proben gleich gehalten wird. Neben den Veränderungen des EOF läßt sich anhand des Quotienten der korrigierten Peakflächen leicht abschätzen, inwiefern das Ausmaß der Proteinadsorption zunimmt. Die Absorptionskoeffizienten  $A_\lambda(X)$  der Analyten hängen u.a. vom pH-Wert des Puffers und dessen Konzentration ab. Gleichzeitig zeigt Abb. 5.27, daß die korrigierten Peakflächen nur innerhalb bestimmter Schwankungsgrenzen unabhängig von der Migrationsgeschwindigkeit sind. Aus diesen Gründen lassen sich anhand des Quotienten der korrigierten Flächen nur halbquantitative Aussagen treffen. Für erste Abschätzungen ist es daher hilfreich, die Meßergebnisse einer Versuchsreihe graphisch darzustellen.

In Abb. 5.27 ist dies für die Meßwerte des internen Standards unter den verschiedenen Versuchsbedingungen geschehen. Anhand der Darstellung lassen sich kritische Versuchsbedingungen z.B. an der Zunahme der Migrationszeiten oder Schwankungen der korr. AU erkennen. Bei den Untersuchungen unterhalb von pH 7,0 treten diese Phänomene auf, was auf massive Probleme durch Proteinadsorption hinweist. Gleichzeitig nimmt der Informationsgehalt der relativen Peakflächen durch die deutlich längeren Migrationszeiten ab.

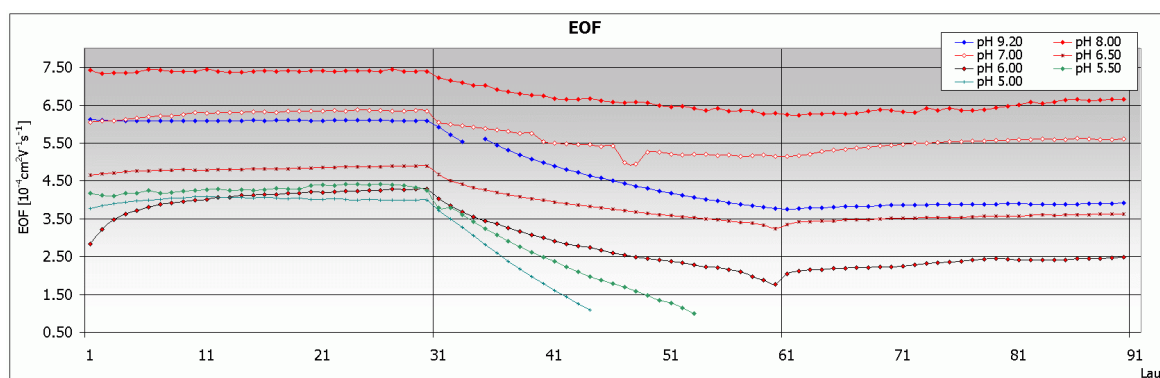


Abbildung 5.28: Catalase; EOF Vergleich

Anhand der Entwicklung des EOF innerhalb einer Meßreihe läßt sich sehr empfindlich ablesen, ob Adsorptionsprozesse ablaufen. In Abb. 5.28 ist der Verlauf der elektroos-

motischen Mobilität dargestellt. Die vertikalen Linien markieren den jeweiligen Beginn eines Teilabschnittes der Untersuchungsreihen. Aus dem Diagramm läßt sich ablesen, daß Adsorptionsvorgänge eine Abnahme des EOF auslösen. Diese ist pH-Wert abhängig und um so ausgeprägter, je größer der Wert für den Term  $IP - pH$  ausfällt. Weiterhin läßt sich bei den Untersuchungen zwischen pH 6,0 und 8,0 feststellen, daß die elektroosmotische Mobilität während der abschließenden Kontrollreihe jeweils geringfügig zunimmt, während sie sich bei pH 9,2 im Rahmen der Meßgenauigkeit nichtmehr verändert. Die Lage der Meßergebnisse bei pH 9,2 ist zunächst verwunderlich, läßt sich aber auf die deutlich geringere Ionenstärke des Borat-Puffers zurückführen und die damit verbundene, geringere Wärmeentwicklung (vgl. Kap. 5.4.1.7).

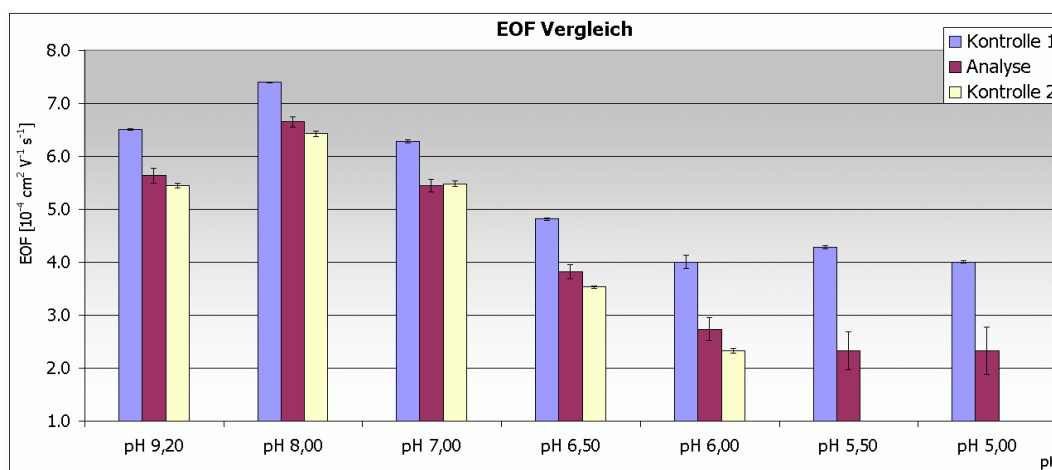


Abbildung 5.29: Catalase; EOF-Balkendiagramm

Bei der eingehenden, statistischen Untersuchung des EOF (Ergebnisse in Abb. 5.29 graphisch dargestellt) kommt man zu dem Ergebnis, daß sich die jeweiligen Teilabschnitte jeder Meßserie, insbesondere bezüglich des EOF, signifikant unterscheiden. Selbst bei der Aufweitung des Konfidenzintervalls durch die Akzeptanz einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha=1\%$  liegen die Mittelwerte zu weit auseinander, um eine Äquivalenz der Mittelwerte annehmen zu können. Lediglich bei pH 7,0 lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der zweiten Kontrollreihe und der Protein-Meßreihe feststellen. Dies liegt an den stark streuenden Werten während der Catalase-Untersuchung. Die Zunahme der elektroosmotischen Mobilität um knapp 6% während der ersten 10 Kontrollläufe zeigt, daß Veränderungen an der Kapillaroberfläche in diesem Zeitraum ablaufen müssen. Aus den Untersuchungen der Catalase können mehrere Schlußfolgerungen gezogen werden. Zunächst ist festzuhalten, daß sich das Protein bei pH-Werten von 5,0 und 5,5, also ungefähr einer pH-Einheit

unterhalb des  $IP$ , nicht in unbeschichteten Kapillaren untersuchen läßt, da der Analyt an der entgegengesetzt geladenen Kieselglasoberfläche adsorbiert. Im Fall der Meßreihe bei pH 5,0 führt dies sogar dazu, daß die Richtung des EOF umgekehrt wird und somit weder qualitative noch quantitative Untersuchungen möglich sind.

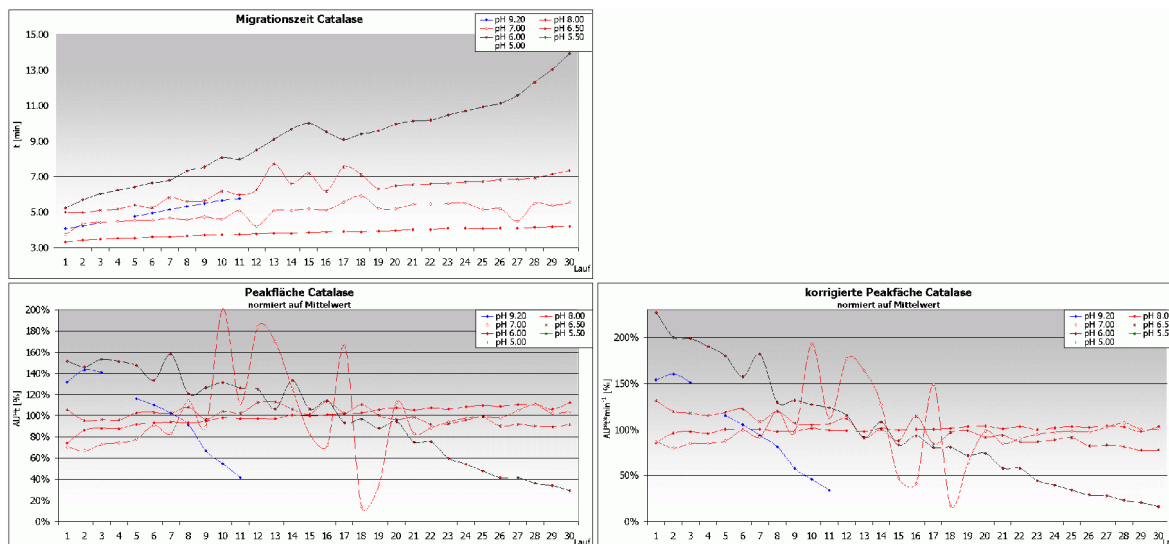


Abbildung 5.30: Catalase pH 6,0 - 9,2

Im Bereich des  $IP_{theo.} = 6,41$  des Proteins verändert sich das kapillarelektrophoretische Verhalten des Proteins deutlich. Im Bereich zwischen pH 6,0 und 7,0 nehmen sowohl die absolute Fläche als auch die korrigierte Peakfläche für das Protein deutlich zu. Bezieht man die jeweiligen Werte auf die Vergleichsgrößen des EOF-Markers, so liegt etwa eine Zehnerpotenz zwischen den korr. AU-Quotienten bei pH 6,0 und 7,0. Daher darf angenommen werden, daß die Wiederfindungsrate des Proteins mit steigender negativer Oberflächenladung zunimmt. Bei pH 8,0 sind die Voraussetzungen soweit erfüllt, daß bei einer weiteren Optimierung der Parameter eine verlässliche, analytische Methode etabliert werden kann. Die Meßreihe bei pH 9,2 liefert hingegen ein unerwartetes Ergebnis. Trotz vergleichbarer Probenmenge und gleichzeitiger Zunahme der negativen Oberflächenpotentiale von Protein und Kieselglasoberfläche lassen sich aller relevanten Größen wie Migrationszeiten und Peakflächen nur schlecht reproduzieren.

Um dieses unerwartete Verhalten verstehen zu können, ist es notwendig, sich eingehender mit den Eigenschaften des Proteins zu befassen. Bovine Catalase liegt unter physiologischen Bedingungen als Tetramer mit einem Masse von 240 kDa vor. Die Untersuchungen zeigen, daß der Einfluß der Molekularmasse auf die Proteinadsorption weniger entscheidend ist als beispielsweise der pH-Wert oder die Pufferzusam-

mensetzung. Die bei den Versuchsreihen zwischen pH 6,0 und 9,2 beobachtete, außerordentliche Breite des Catalase-Peaks läßt sich nicht auf verschiedene Isoformen zurückführen, da das Enzym durch ein einziges Gen codiert wird [129]. Im Fall des von Regnier et al. untersuchten Adsorptionsverhaltens von Cytochrom C (*Equus asinus*) wurde gezeigt, daß eine isolierte Domäne mit mehreren Lysinresten für die Wechselwirkungen mit negativ geladenen Oberflächen verantwortlich ist. Um eine mögliche Analogie ausschließen zu können, greift man auf röntgenkristallographische Daten der Catalase zurück. Die in Abb. 5.31 gezeigte Quartärstruktur Enzyms basiert auf dem Datensatz 4BLC.pdb aus der Brookhaven Proteindatenbank. Während die Struktur (1) das Oberflächenpotential bei pH 7,0 zeigt, sind in Darstellung (3) die für Wassermoleküle zugänglichen, polaren Aminosäurereste gemäß ihrer Ladung entweder blau (Lysin, Arginin), rot (Asparagin-, Glutaminsäure) oder türkis (Histidin) eingefärbt. In beiden Fällen sind keine kationischen Domänen zu erkennen, die als mögliche Kontaktfläche mit der Kapillaroberfläche starke ionische Wechselwirkungen eingehen können. Darstellung (2) zeigt die Monomere in verschiedenen Blautönen.

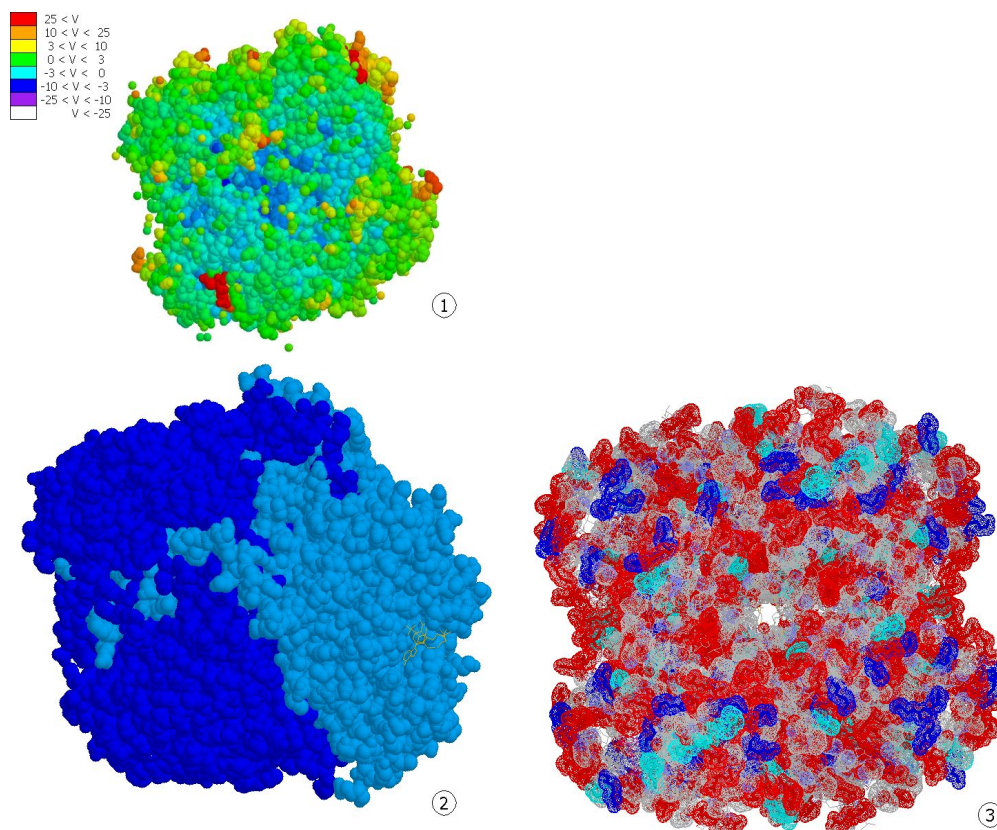


Abbildung 5.31: Catalase Struktur und Oberflächenpotential

Aus der Struktur des Proteins lassen sich somit keine direkten Hinweise finden, welche die Peakform des Proteins erklären können. Außerdem wird in verschiedenen Ar-



beiten [118][129] gezeigt, daß die bovine Catalase in der Lage ist, sich auch unter stark denaturierenden Bedingungen zurückzufalten. Eine der Voraussetzung dafür ist aber, daß stabilitätserhöhende Salze mit taxigenen Eigenschaften aus der Hofmeister-Serie zugesetzt werden (vgl. Kap. 5.2.4.2). Dazu gehört auch Monohydrogenphosphat, was die Unterschiede der Messungen bei pH 8,0 im Vergleich zu den anderen Serien erklärt. Ionen mit taxigenen Eigenschaften bewirken, daß dem Protein ein Teil der Solvatmoleküle entzogen wird, indem die Tendenz zur Bildung von Wasserclustern zunimmt.

Weiterhin muß das Phänomen der Kooperativität berücksichtigt werden [129], das von di- und oligomeren Proteinen, z.B. auch bei Hämoglobin, bekannt ist. Daher kann man davon ausgehen, daß sich in der Probenzone unterschiedliche Konformere der Catalase befinden. Mit Konformationsänderungen ist aber auch eine Veränderung des effektiven, Stokes'schen Radius verbunden. Aus Gl. 11 wird ersichtlich, daß sich sowohl die effektive Ladung  $Q_{\text{eff}}$  als auch der hydrodynamisch relevante Radius  $r_{\text{eff}}$  verändern können und damit die Migrationsgeschwindigkeit des Proteins beeinflussen.

Im Gegensatz zu niedermolekularen, organischen Verbindungen verläuft der Übergang eines Proteins von einer Konformation in eine andere deutlich langsamer. In diesem Zusammenhang muß man zusätzlich das Trichter-Modell berücksichtigen. Dieses beruht darauf, daß man den hochdimensionalen Parameterraum, der zur Beschreibung einer Proteinstruktur notwendig ist, auf eine Ebene projiziert. Jedem einzelnen Parametersatz ordnet man die zugehörige innere Energie des Proteins zu und erhält eine trichterförmige Landkarte (energy landscape) der inneren Energie eines Proteins. Dieses Trichter-Modell weist bei jedem Protein lokale Minima auf, die von mehr oder weniger ausgeprägten Energiebarrieren begrenzt werden. Alle Konformationen, die innerhalb einer dieser Barrieren liegen, werden als Ensemble einer Proteinstruktur bezeichnet [107][130]. Im Fall der bovinen Catalase ist eine Vielzahl von Ensembles bekannt [118][129]. Durch intermolekulare Kooperation und äußere Faktoren wie Temperatur, Scherkräfte und extreme pH-Werte nimmt die Anzahl der möglichen Konformere nochmals zu. Auch die vielfältigen Strukturen des Catalase-Moleküls können die ungewöhnliche Peakform erklären. Ein weiterer Grund für das uneinheitliche Migrationsverhalten besteht darin, daß Proteine Substanzen mit Puffer-eigenschaften sind. Bei der Gefriertrocknung lassen sich Abbauprozesse nicht ver-



meidlich, so daß man davon ausgehen kann, daß die Catalase ein mikroheterogenes Gemisch von Substanzen mit geringfügig unterschiedlichen IP darstellt [131]. In der Probenzone kann es daher zu Veränderungen des pH-Wertes und zur Ausbildung eines Gradienten kommen. Folglich liegen mit der CIEF vergleichbare Bedingungen vor (vgl. Kap. 1.3.1), was sich in diesem Kapillarsegment auch auf die auf die Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Fraktionen auswirkt.

## 5.4.2 Einfluß der Pufferzusammensetzung

### 5.4.2.1 Borat-Puffer – reduzierte Proteinmenge

Aufgrund der Ergebnisse bei pH 9,2 soll durch eine weitere Versuchsreihe geklärt werden, ob die schlechte Wiederholpräzision durch eine zu große Proteinmenge bedingt wird, oder ob andere Faktoren, wie eine Inkompatibilität des Proteins mit dem verwendeten Borat-Puffer, ausschlaggebend für die Probleme sind. Deshalb wird das Experiment unter identischen Bedingungen wiederholt, wobei die pro Lauf injizierte Analytenmenge halbiert und zusätzlich die Analysenzeit auf 10 min verlängert wird. Um systemimmanente Probleme ausschließen zu können, wird auch bei dieser Meßreihe die Systempräzision ermittelt (vgl. Tab. 5.4.2.1.1). Die Schwankungen der relevanten Größen, insbesondere der elektroosmotischen Mobilität, liegen mit  $RSD\% = 0,69\%$  auf vergleichbar niedrigem Niveau wie bei der vorausgegangenen Meßreihe.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	2,953	2,946	2,960	0,020	0,684	0,00041
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	14,861	14,820	14,903	0,116	0,782	0,01349
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	5,033	5,012	5,054	0,059	1,177	0,00351
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	6,503	6,487	6,519	0,045	0,687	0,00200

Tabelle 5.4.2.1.1: System-Test, pH 9,2 EOF-Marker (CATA-030505)

Bei den Untersuchungen ergibt sich ein vergleichbares Bild wie bei der vorausgegangenen Meßreihe (Abb. 5.32). Neben der allgemeinen Zunahme der Migrationszeiten ist besonders die Peakform des Proteins (3) hervorzuheben. Im Gegensatz zu den Signalen von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) handelt es sich um keine scharf begrenzte Probenzone, sondern um einen weit ausufernden Peak, dessen Breite über 90 s beträgt. Neben dieser eigentümlichen Peakform läßt sich auch das Phänomen reproduzieren, daß der Peak des EOF-Markers in den der Catalase direkt überzugehen scheint. Die ungewöhnliche Form des Protein-Peaks scheint durch Überlagerung von Proteinfractionen zu Stande zu kommen. Allerdings lassen sich Peak-Maxima der

beiden Hauptfraktionen nur schlecht erkennen. Vergleicht man die Ergebnisse der statischen Auswertung beider Meßserien miteinander, fällt auf, daß sich die Reduktion der Proteinmenge positiv auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auswirkt.

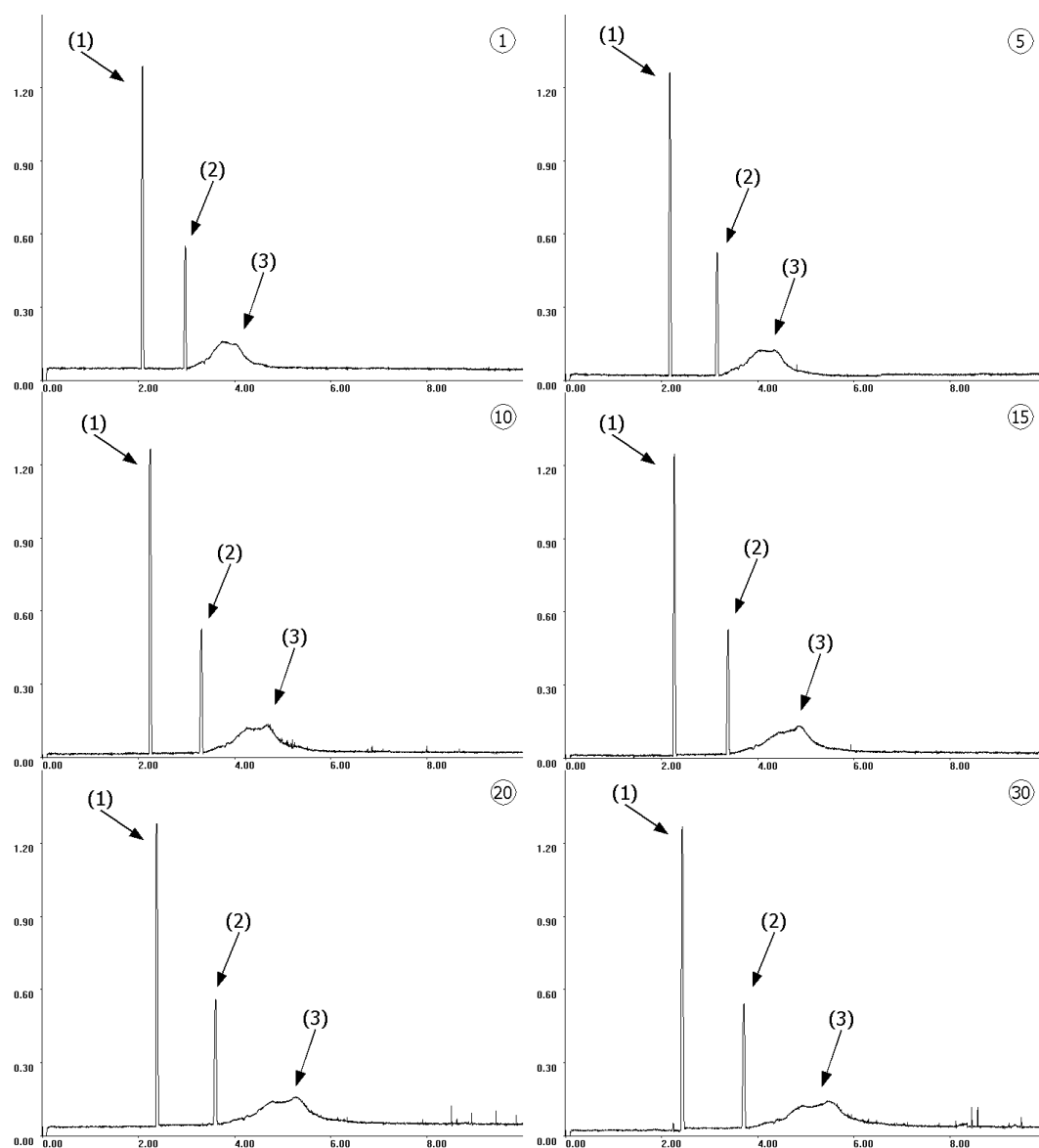


Abbildung 5.32: Catalase ( $\sim 9$  ng pro Injektion; CATA-030505)  
Borat-Puffer pH 9,2,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 36 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,421	3,340	3,502	0,227	6,626	0,05140
Fläche [AU·min]	Acetanilid	15,975	15,592	16,357	1,070	6,696	1,14418
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	4,670	4,641	4,698	0,080	1,714	0,00640
EOF [ $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,636	5,499	5,773	0,383	6,800	0,14691
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Catalase	4,864	4,672	5,057	0,538	11,058	0,28931
Fläche [AU·min]	Catalase	70,433	66,906	73,959	9,855	13,992	97,12624
korr. Fläche [AU]	Catalase	14,447	14,173	14,721	0,765	5,295	0,58517

Tabelle 5.4.2.1.2: Catalase pH 9,2, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-030505)

Die elektroosmotische Mobilität nimmt innerhalb der Meßreihe ( $n=30$ ) um  $RSD\% = 20\%$  ab. Auch die Schwankungen der Migrationszeiten und Peakflächen lassen sich durch diese Maßnahme reduzieren (s. Tab. 5.4.2.1.2). Im Vergleich zu den Ergebnissen bei pH 8,0 sind die Streuungen bei pH 9,2 deutlich schlechter, trotz der reduzierten Menge der Analyten. Nur die Ergebnisse der korr. AU liegen auf einem vergleichbaren Niveau. Die abschließenden Kontrollversuche zeigen, daß bei beiden Vergleichssubstanzen die Migrationsgeschwindigkeiten geringfügig zunehmen. Zwar nimmt der EOF zu, allerdings werden am Ende der Meßreihe lediglich 86% des Mittelwertes der ersten Kontrollserie erreicht. Die  $RSD\% (\mu_{EOF})$  liegt mit etwa 2,2% über den Ausgangswerten. Daher muß man annehmen, daß die Verminderung des EOF von der injizierten Proteinmenge abhängt. Ein Teil der beobachteten Effekte läßt sich so erklären, für die ungewöhnliche Peakform fehlt aber eine plausible Erklärung.

#### 5.4.2.2 Phosphat-Puffer

Um einen möglichen Einfluß der Pufferbestandteile auf die Adsorptionsprozesse und damit auch auf die Reproduzierbarkeit untersuchen zu können, wird eine 50 mM Phosphat-Lösung pH 9,2 verwendet. Obwohl die Pufferkapazität dieser Lösung bei diesem pH-Wert äußerst gering ist, wird eine Meßreihe mit dieser Elektrolytlösung durchgeführt, um deren Resultate direkt mit den Untersuchungen bei pH 8,0 vergleichen zu können. Um der geringen Pufferwirkung Rechnung zu tragen, wird die Kapillare nach jedem Lauf intensiv mit unverbrauchter Pufferlösung gespült und zusätzlich das Einlaßgefäß für die Elektrophorese nach wenigen Läufen komplett ausgetauscht.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,700	2,685	2,714	0,041	1,505	0,00165
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	26,184	25,975	26,392	0,584	2,230	0,34080
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	9,698	9,647	9,750	0,144	1,488	0,02084
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	7,113	7,075	7,152	0,107	1,505	0,01146

Tabelle 5.4.2.2.1: System-Test, pH 9,2 EOF-Marker (CATA-100505)

Unter diesen Bedingungen kommt der eingehenden Prüfung der Systempräzision große Bedeutung zu, da sonst keine verlässlichen Ergebnisse gewonnen werden können. Die Resultate des System-Tests sind mit etwas größeren Schwankungen behaftet (Tab. 5.4.2.2.1) als bei den Meßreihen mit einem Borat-Puffer. Allerdings muß bei der Streuung der elektroosmotischen Mobilität ( $RSD\%=1,51\%$ ) berücksichtigt werden, daß nicht nur Schwankungen des pH-Wertes zur Gesamtvarianz beitragen, son-

dem auch die frei werdende Wärme als Fehlerquelle ebenfalls mit einbezogen werden muß. Die RSD%-Werte des internen Standards liegen bei  $t_{\text{Mig}}$ , AU und korr. AU allesamt unter 1,50%, während lediglich die Peakfläche von Acetanilid mit 2,23% oberhalb dieser Grenze liegt.

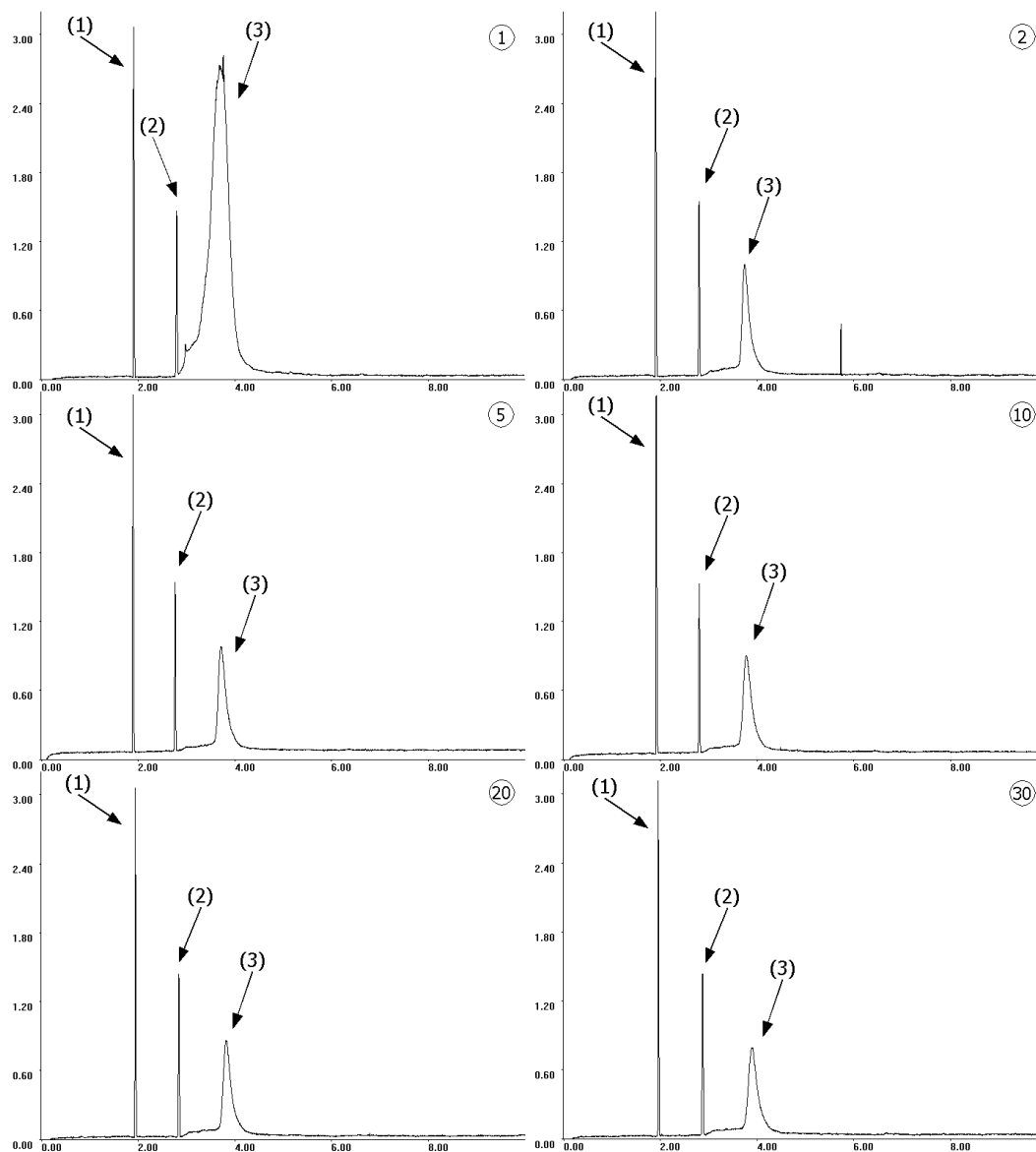


Abbildung 5.33: Catalase (~ 16 ng pro Injektion; CATA-100505)  
Phosphat-Puffer pH 9,2, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 121 µA; Läufe 1, 2, 5, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu den Untersuchungen bei niedrigeren pH-Werten zu haben, wird die injizierte Proteinmenge gegenüber den bisherigen Meßreihen nicht vermindert. Mit Ausnahme der Läufe 1 und 17 der Meßreihe (Abb. 5.33) lassen sich sowohl das Peakmuster als auch die Migrationszeiten und Peakflächen aller Analyten sehr gut reproduzieren. Bei diesen beiden Elektropherogramme tritt die Besonderheit auf, daß die Flächenwerte des jeweiligen Catalase-Peaks (3) deutlich über

dem arithmetischen Mittel liegen, die Peaks selbst aber das gleiche Migrationsverhalten aufweisen wie in den anderen Läufen auch. Ein Injektionsfehler kann gleichzeitig ausgeschlossen werden, da die Abweichung bei den Peakflächen von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) nicht auftritt. Außerdem fällt auf, daß sich die Peakform des Proteins kaum von den Elektropherogrammen bei pH 8,0 unterscheidet. Vergleicht man die Ergebnisse des Systemtests mit denen der Meßreihe (Tab. 5.4.2.2.2), fällt auf, daß die Migrationszeiten aller Analyten nur geringfügig zunehmen und sich besser reproduzieren lassen als unter Verwendung des Borat-Puffers, bedingt durch die weniger ausgeprägte Adsorption des Proteins. Zudem schwanken die Werte für Peakflächen und korrigierte Peakflächen der Vergleichssubstanzen in der Versuchsreihe weniger als vergleichsweise bei pH 8,0.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	2,812	2,797	2,826	0,040	1,431	0,00162
Fläche [AU·min]	Acetanilid	26,084	25,805	26,363	0,779	2,985	0,60642
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	9,275	9,204	9,347	0,200	2,161	0,04017
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,830	6,795	6,865	0,098	1,432	0,00957

Tabelle 5.4.2.2.2: Catalase, pH 9,2 EOF-Marker (CATA-100505)

Bleiben die Ausreißer aus den Läufen 1 und 17 unberücksichtigt bei der Auswertung der Catalase (Tab. 5.4.2.2.3), läßt sich die RSD% für AU und korrr. AU auf 6% reduzieren und damit eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisherigen Untersuchungen bei pH 9,2 erzielen. Aus den abschließenden Kontrollversuchen kann geschlußfolgert werden, daß es zu keinen relevanten Veränderungen im Bereich der Kapillaroberfläche mehr kommt, da die Schwankungen der Migrationszeiten und des EOF unter 1% liegen bzw. die Flächen um 0,89 bzw. 1,69% streuen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Läufe 2-30							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Catalase	3,775	3,748	3,803	0,076	2,010	0,00576
Fläche [AU·min]	Catalase	151,581	143,425	159,736	22,407	14,782	502,06930
korrr. Fläche [AU]	Catalase	40,172	37,974	42,370	6,040	15,034	36,47661
Läufe 1-30							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Catalase	3,775	3,748	3,802	0,075	1,975	0,00556
Fläche [AU·min]	Catalase	178,652	125,012	232,292	149,900	83,906	22470,11169
korrr. Fläche [AU]	Catalase	47,361	33,111	61,611	39,822	84,081	1585,79891

Tabelle 5.4.2.2.3: Catalase pH 9,2, Läufe 2-30 bzw. Läufe 1-30 (CATA-100505)

### 5.4.2.3 Borat-Phosphat-Puffer

Aufgrund der interessanten Resultate bei Verwendung einer phosphathaltigen Elektrolyt-Lösung soll durch eine weitere Meßreihe geklärt werden, ob der simple Zusatz

von Phosphaten als anti-adhäsivem Zusatz zu deutlichen Verbesserungen der Reproduzierbarkeit führt. Aus diesem Grund wird ein 50 mM Borat-Puffer verwendet, dem Phosphat zugesetzt wird (10 mM). Die resultierende Ionenstärke von ca. 55 mM liegt etwas höher als bei dem ursprünglichen 100 mM Borat-Puffer (ca.  $I=50$  mM), besitzt aber eine wesentlich bessere Pufferkapazität im Vergleich zum Phosphat-Elektrolyten.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid		2,863	2,858	2,869	0,015	0,521	0,00022
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		20,075	19,951	20,200	0,347	1,728	0,12040
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid		7,011	6,976	7,045	0,097	1,379	0,00935
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid		6,706	6,693	6,718	0,035	0,524	0,00123

Tabelle 5.4.2.3.1: System-Test, pH 9,2 EOF-Marker (CATA-160505)

Die Meßwerte aus der einleitenden Systempräzision weisen einen konstanten EOF auf, wobei die elektroosmotische Mobilität um 0,52% schwankt (vgl. Tab. 5.4.2.3.1). Darüber hinaus streuen die Peakflächen (AU / korr. AU) des internen Standards bzw. des EOF-Markers um maximal 1,21%.

Bei der im direkten Anschluß durchgeführten Untersuchung der Catalase (Abb. 5.34) beobachtet man eine allgemeine Zunahme der Migrationszeiten (vgl. Tab. 5.4.2.3.2) des makromolekularen Analyten (3), von Acetanilid (2) und Neostigmin (1). Dieser Prozeß beschränkt sich auf die ersten 10 Läufe, danach liegt die Schwankung der Migrationszeiten aller Analysenbestandteile bei höchstens 0,5% RSD.

Experiment			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid		3,044	3,026	3,062	0,050	1,652	0,00253
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		20,260	20,023	20,498	0,663	3,273	0,43964
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid		6,656	6,575	6,738	0,228	3,423	0,05191
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid		6,309	6,270	6,347	0,107	1,690	0,01137
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Catalase		4,120	4,085	4,155	0,098	2,370	0,010
Fläche	[AU·min]	Catalase		98,914	97,277	100,551	4,576	4,626	20,938
korr. Fläche	[AU]	Catalase		24,003	23,725	24,281	0,776	3,232	0,602

Tabelle 5.4.2.3.2: Catalase pH 9,2, Ergebnisse EOF-Marker und Protein (CATA-160505)

Die Peakflächen hingegen unterliegen deutlicheren Schwankungen von 2,63-4,63% RSD; diese lassen sich sowohl für die gesamte Serie als auch die Läufe 11-30 dadurch reduzieren, daß man die relativen Flächen berechnet. Dieser Umstand weist auf mögliche Probleme bei der Probeninjektion hin. Bei der visuellen Auswertung der Elektropherogramme fällt auf, daß die Catalase-Zone das Detektionsfenster deutlich schneller passiert als beim 100 mM Borat-Puffer (1,7 min bzw. 2,1 min), obwohl die durchschnittliche elektroosmotische Mobilität jeweils  $5,64 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  beträgt.

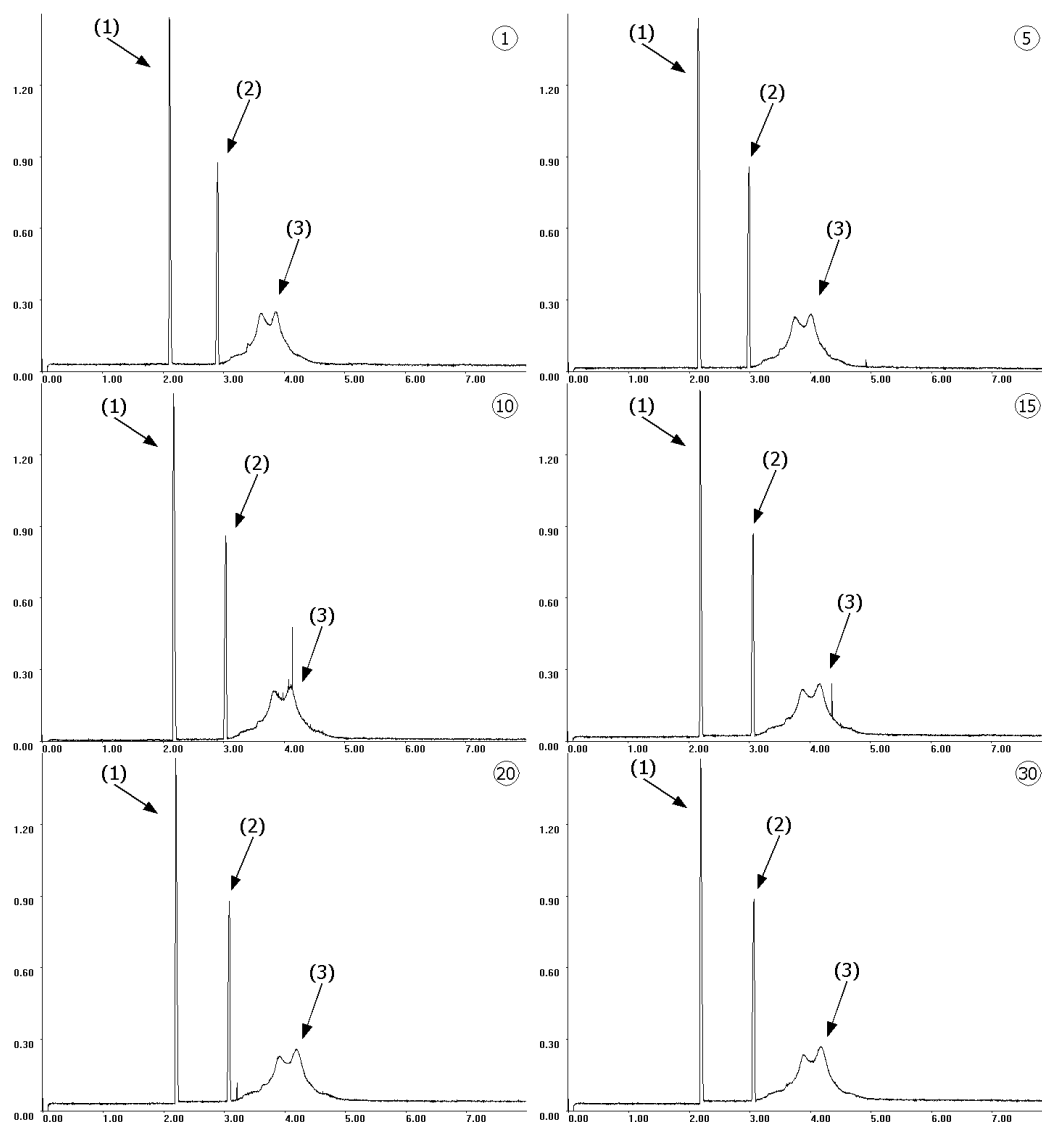


Abbildung 5.34: Catalase ( $\sim 16$  ng pro Injektion; CATA-160505)  
 Borat-Phosphat-Puffer pH 9,2,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 121 \text{ } \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Catalase

Die Peakform weist sowohl Merkmale auf, die bei der Verwendung des Borat-Puffers auftreten (Peakbreite und zwei Peak-Maxima) als auch solche, die in der Phosphat-Lösung beobachtet werden (langgezogene Schulter auf der aufsteigenden Flanke, schärfer begrenzte Peaks). Bei der nachfolgenden Untersuchung der Systempräzision nimmt die Streuung der Meßwerte allgemein ab, allerdings liegt eine deutliche Zunahme des EOF um knapp 9% vor und erreicht damit die Werte, die beim ersten System-Test erzielt wurden. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, daß sich die Proteinplaques auf der Kapillaroberfläche verändern und teilweise wieder ausgewaschen werden. Das läßt sich aber nur durch entsprechende XPS- bzw. kraftfeldmikroskopische Untersuchungen klären.

#### 5.4.2.4 Diskussion der Teilergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen bei pH 9,2 liefern einige sehr interessante Erkenntnisse. Dazu gehört die deutliche Abhängigkeit der Catalase-Peakform von der Zusammensetzung des verwendeten Puffers. Weiterhin läßt sich anhand der Ergebnisse zeigen, daß nicht nur der pH-Wert der Elektrolytlösung die Reproduzierbarkeit beeinflußt, sondern daß die verwendeten Puffersubstanzen maßgeblichen Einfluß auf die Wiederholpräzision innerhalb der Meßreihe haben.

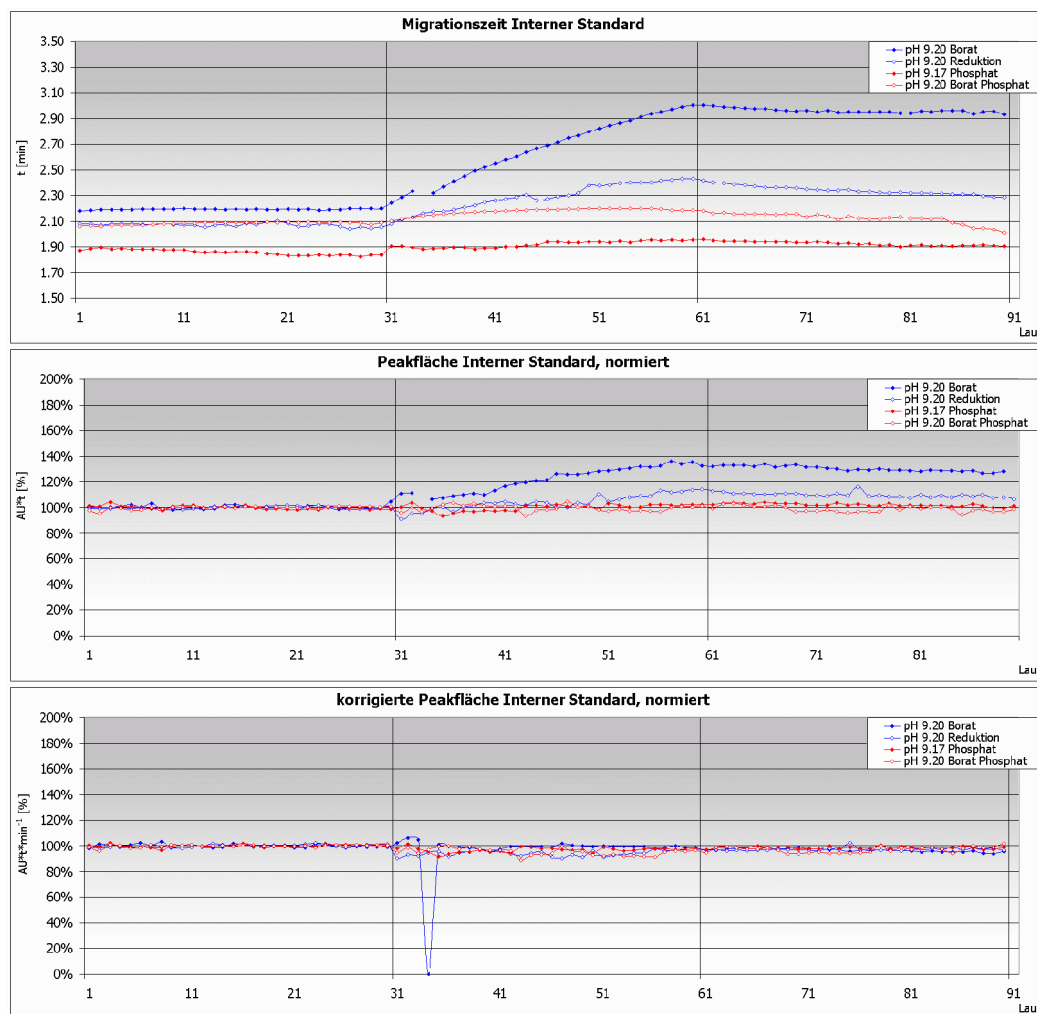


Abbildung 5.35: Neostigmin pH 9,2

Vergleicht man die Ergebnisse für Neostigmin, so lassen sich anhand der graphischen Darstellung der Meßwerte (Abb. 5.35) schon die grundlegenden Unterschiede aufzeigen. In beiden Versuchsreihen, die unter Verwendung eines 100 mM Borat-Puffers durchgeführt werden, läßt sich eine deutliche Zunahme der Migrationszeiten während der Catalase-Untersuchungen nachweisen. Im Gegensatz dazu ist in den Meßreihen, bei denen die Elektrolyt-Lösung Phosphat enthält, eine weitaus schwächer ausge-



prägte Abnahme der scheinbaren elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{app}$  bei Neostigmin zu beobachten.

Das Ergebnis weist bereits darauf hin, daß sich die Verwendung von Monohydrogenphosphat positiv auf die Reproduzierbarkeit auswirkt, indem die Quartärstruktur von boviner Catalase durch den taxigenen Effekt der Pufferanionen stabilisiert wird (vgl. Kap. 5.2.4.2. und 5.4.1.8). Es ist daher auch nicht verwunderlich, daß die Schwankungen der absoluten Peakflächen niedriger sind als in den Versuchsreihen, bei denen, in denen der 100 mM Borat-Puffer verwendet wird. Die Streuung der korrigierten Flächen von Neostigmin liegt bei allen Untersuchungsreihen des Proteins zwischen 2 und 3%.

Die Reduktion des EOF, die durch die Adsorption der Catalase ausgelöst wird, stellt in Bezug auf die angestrebte Reproduzierbarkeit die größte Schwierigkeit dar. Bei allen Meßreihen schwankt die elektroosmotische Mobilität kaum in den System-Tests. Im Gegensatz dazu beobachtet man während der Proteinuntersuchung einen deutlichen Abfall des EOF beim Borat-Puffer. Auch hier existieren meßbare Unterschiede zu den Versuchsreihen, in denen die Lösung der Hintergrundelektrolyte Phosphat enthält. Vergleicht man Ergebnisse der statistischen Auswertung der verschiedenen Meßreihen miteinander, fällt auf, daß beim Test auf heteroskedastisch verteilte Stichproben sich alle Untersuchungen signifikant, selbst bei  $\alpha=1\%$ , unterscheiden. Wesentlich wichtiger als die nachweislichen Unterschiede zwischen allen Meßreihen ist die Beobachtung, daß der F-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Standardabweichungen von  $t_{Mig}$  und  $\mu_{EOF}$  erkennt, die aus den Untersuchungen in borathaltigen Lösungen stammen. Grund hierfür ist nicht etwa, daß vergleichbare Streuungen vorliegen, sondern daß die Standardabweichungen von  $3,83$  bzw.  $6,44 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  so groß sind bei reinem Borat-Puffer, daß der Wert von  $\sigma=1,073 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  beim Borat-Phosphat-Puffer noch etwas zu groß ist, um als signifikanter Unterschied ermittelt werden zu können.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich im Verhalten während der abschließenden Kontrollreihe, wie die graphische Darstellung der Meßwerte zeigt. Während sich der EOF bei reinen Borat-Puffern nicht mehr ändert oder nur geringfügig zunimmt, verhält sich das CE-System bei den phosphathaltigen Lösungen anders (Abb. 5.36). In beiden Fällen erreicht  $\mu_{EOF}$  wieder die ursprüngliche Größe. Dies läßt sich anhand der

EOF-Balkendiagramme nicht ableiten, da hier die Mittelwerte gegeneinander aufgetragen werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang bei der Meßreihe mit der Phosphat-Lösung, daß sich sowohl die Ergebnisse bei den Migrationszeiten und als auch bei der elektroosmotischen Mobilität nicht statistisch signifikant unterscheiden, wenn die Werte aus Catalase-Untersuchung und der zweiten Kontrollserie verglichen werden. Dieses Ergebnis spricht für stabile, analytische Bedingungen, die sich allerdings bei der Auswertung der Ergebnisse für die Catalase nicht bestätigen.

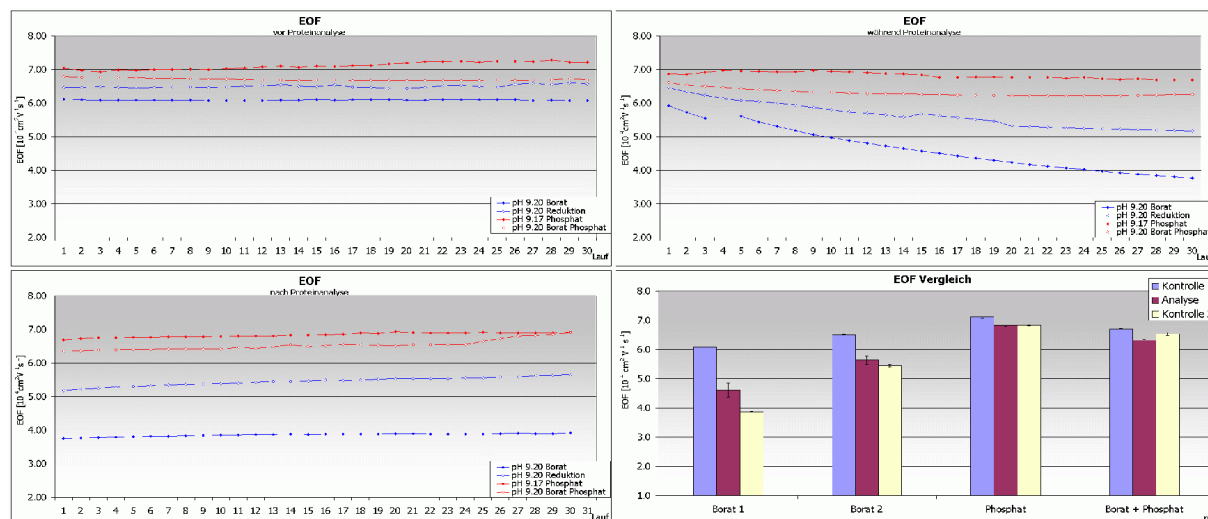


Abbildung 5.36: EOF, Catalase pH 9,2

An dieser Stelle kann eine irreversible Proteinadsorption an der Kieselglasoberfläche als Ursache der schwankenden Meßwerte ausgeschlossen werden. Die Standardabweichungen von  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  unterscheiden sich bei der abschließenden Kontrollserie mit dem phosphathaltigen Borat-Puffer und der Proteinanalyse nicht signifikant. Aus statistischer Sicht lassen sich zwar die zugehörigen Mittelwerte verschiedenen Grundgesamtheiten zuordnen, eine Differenz von  $\Delta t_{\text{Mig}} = 5 \text{ s}$  hat allerdings keine praktische Relevanz. Da gleichzeitig die korrigierten Peakflächen der Catalase eine leichte Zunahme aufweisen, deutet das Ergebnis dieser Meßreihe auf eine reversible Proteinadsorption hin. Es läßt sich aber nicht klären, ob die adsorbierten Proteinmoleküle wieder vollständig desorbiert werden, oder ob bestehende Proteinplaques den EOF deshalb nicht nennenswert beeinflussen, weil sich an der Proteinoberfläche ebenfalls ein negatives Potential ausbildet.

Die Meßreihe mit reduzierter Proteinmenge zeigt, daß sich die Streuung der Meßwerte durch diese Maßnahme reduzieren läßt. Im Besonderen betrifft dies die korrigierten Peakflächen der Catalase, wo die RSD% von 45,7% auf 5,3% sinkt. Die Reprodu-

zierbarkeit der Migrationszeiten des Proteins läßt sich ebenfalls dadurch verbessern. Obwohl vergleichbare RSD%-Werte resultieren (12% für  $n=9$ , CATA-051105; 11,1% bei  $n=30$ , CATA-030505), lassen sie sich nicht ohne weiteres miteinander vergleichen. Da die Migrationszeiten von Acetanilid und Neostigmin in der ersten Meßreihe über den neunten Lauf hinaus zunehmen, muß ähnliches auch für die Catalase angenommen werden. Dadurch ergäben sich größere RSD%-Werte, die deutlich über den Schwankungen der zweiten Meßreihe lägen.

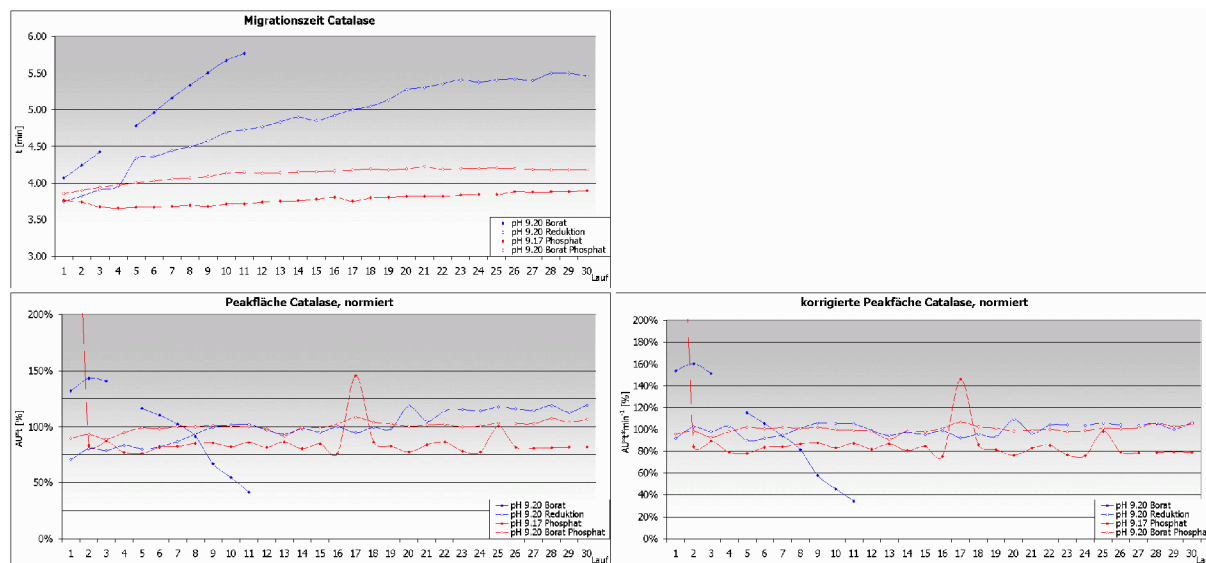


Abbildung 5.37: Ergebnisse Catalase pH 9,2

Die gemessene Zunahme der Migrationszeiten bedeutet aber auch, daß die Catalase an der Kieselglasoberfläche adsorbiert, was auf das grundsätzliche Problem bei der Wiederfindung hinweist. Die Verwendung einer 50 mM Phosphat-Lösung bringt dem gegenüber eine wesentliche Verbesserung, da die RSD% der Migrationszeiten auf 2,0% reduziert wird (vgl. Abb. 5.37). Allerdings tritt das Problem auf, daß die Streuung der Peakflächen in der Meßreihe durch wenige Ausreißer massiv beeinflusst wird. Die RSD%-Werte der Flächen und korrigierten Flächen wird durch zwei Ausreißer von 5,7% bzw. 6,0% auf 83,9% respektive 84,0% erhöht. Da sich diese Extremwerte allein für die Catalase beobachten lassen, interner Standard und EOF-Marker aber davon unberührt bleiben, kann davon ausgegangen werden, daß die Phosphat-Ionen selbst die Proteineigenschaften beeinflussen und die Ausreißer verursachen. Geht man davon aus, daß durch die Stabilisierung der Proteinstruktur auch die Bildung von Proteinclustern gefördert wird, könnten die Ausreißer dadurch erklärt werden.

Die Verwendung eines 50 mM Borat-Puffers, dem Phosphat-Ionen (10 mM) zugesetzt werden, bringt deutliche Vorteile gegenüber den anderen Hintergrundelektrolyten. Im Vergleich zur 50 mM Phosphat-Lösung läßt sich Präzision und Robustheit der Flächen auf Kosten der Migrationszeiten ( $t_{\text{Mig}}$ , und  $\text{RSD}\%(t_{\text{Mig}})$ ) verbessern. Gegenüber dem Borat-Puffersystem wird ein deutlicher Fortschritt erreicht. Allerdings zeigt die graphische Darstellung der gemessenen elektroosmotischen Mobilität in Abb. 5.36, daß auch die Verwendung des komplexeren Puffersystems noch weiter optimiert werden kann. Sowohl bei den Migrationszeiten als auch den korrigierten Flächen liegt bei den ersten Läufen ein Trend vor, so daß hinsichtlich der Phosphat-Konzentration noch Optimierungsbedarf besteht.

Bei Untersuchungen der Enzymaktivität wurde festgestellt, daß die BLC ihre katalytische Aktivität bei pH 11,0 vollständig verliert und diese bereits bei pH 10,2 auf den halbmaximalen Wert absinkt. Berücksichtigt man weiterhin, daß die enzymatischen Eigenschaften der Catalase auch bei einer partiellen Entfaltung der Tetramere nicht verloren gehen, muß man auch bei pH-Werten von etwa 9,2 mit einer teilweisen Denaturierung rechnen. Dieser Umstand erklärt auch teilweise die Probleme, die bei der Verwendung des 100 mM Borat-Puffers auftreten.



## 5.5 $\beta$ -Lactoglobulin – ein saures, dimeres Protein

Bei  $\beta$ -Lactoglobulin handelt es sich um einen der Hauptbestandteile der Kuhmilch (Organismus: *Bos taurus*). Das Protein, ein Dimer, stellt ein Gemisch der verschiedenen Varianten A-D und W dar, die sich in ein oder zwei Positionen der Aminosäuresequenz unterscheiden. Es fungiert als Transportprotein für hydrophobe Substanzen wie Fettsäuren und Retinol, die in den  $\beta$ -Barrel-Hohlraum des Dimers eingelagert werden [132]. Die Quartärstruktur ist nur im pH-Bereich zwischen 3 und 8 stabil, außerhalb dieses Intervalls erfolgt die Dissoziation in die Monomere [6]. Die konformative Stabilität des  $\beta$ -Lactoglobulins nimmt in schwach alkalischer Lösung rapide ab, so daß die Tertiärstruktur bereits bei Raumtemperatur spontan zerstört wird.

Die bei den Untersuchungen verwendete Substanz ist ein Gemisch der Varianten A und B, die sich lediglich in zwei Positionen unterscheiden und sich aufgrund der ähnlichen IP kaum voneinander trennen lassen. Diese liegen theoretisch bei etwa 4,8, in Experimenten wurden hingegen Werte um 5,3 [133] ermittelt. Während die Variante A an Positionen 64 einen Asparagin- und an Stelle 118 einen Valin-Rest trägt, befinden sich in der Sequenz der Variante B an diesen Stellen Glycin (64) und Alanin (118). Die gesamte Primärstruktur umfaßt 162 Aminosäuren. Von den fünf Cystein-Resten liegen vier als Cystin-Gruppen vor (Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>160</sup> und Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>119</sup> bzw. Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>121</sup>). Man nimmt an, daß die Thiol-Gruppe von Cys<sup>121</sup> an der irreversiblen Denaturierung im Alkalischen beteiligt ist und die Bildung von intermolekularen Disulfid-Brücken ermöglicht [108][132]. Die Varianten A und B unterscheiden sich nicht nennenswert in ihrer Röntgenkristallstruktur, wohl aber in wäßriger Lösung. Die Konformationsübergänge erfolgen bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 4-9 [134]. Bei den Versuchen soll geklärt werden, wie deutlich sich diese Eigenschaften auf das elektrophoretische Verhalten des Proteins auswirken. Insbesondere die geringe Stabilität der Tertiär- und Quartärstruktur im Bereich oberhalb von pH 7 ist ein Hauptfokus der Untersuchungen. Bei der Filtration der Proteinlösung durch die 220 nm großen Poren kann die Stabilität der Quartärstruktur durch die wirkenden Scherkräfte beeinträchtigt werden. Deshalb werden zur Kontrolle auch Versuchsreihen durchgeführt, bei denen auf diesen vermeintlich kritischen Schritt verzichtet wird. Zusätzlich läßt sich dadurch klären, unter welchen Bedingungen sich eventuell vorhandene Proteinassoziate negativ auf die Analysenmethode auswirken.

### 5.5.1 Untersuchungen in unbeschichteten Kapillaren

#### 5.5.1.1 Acetat-Puffer pH 5,0

Für die Durchführung der Untersuchungen wird ein 50 mM Acetat-Puffer verwendet. Genaue Angaben zu den Versuchsbedingungen finden sich in Kap. 9.3.1 und 9.6.1. Zu Beginn beider Meßreihen wird die Systempräzision bestimmt. Die Ergebnisse für den EOF-Marker sind in Tab. 5.5.1.1.1 zusammengefaßt. Die Schwankungen bei der Serie b-LAC-160403 sind auf zwei Ausreißer zu Beginn der Messungen zurückzuführen, wichtiger ist daß der EOF keinen größeren Schwankungen unterliegt.

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
mit Filtration		(b-LAC-160403))						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,983	4,955	5,012	0,080	1,611	0,00644
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	51,375	51,076	51,674	0,835	1,625	0,69662
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	10,312	10,232	10,391	0,222	2,150	0,04914
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,854	3,832	3,876	0,062	1,614	0,00387
ohne Filtration		(b-LAC-160403)						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	5,884	5,720	6,047	0,251	4,261	0,06286
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	26,832	21,940	31,724	7,488	27,908	56,07290
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	4,608	3,679	5,538	1,423	30,872	2,02410
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,268	3,180	3,357	0,135	4,128	0,01820

Tabelle 5.5.1.1.1: System-Test, pH 5,0 EOF-Marker

Im Anschluß wird  $\beta$ -Lactoglobulin untersucht. Bei dem vorliegenden pH-Wert weist das Protein nur eine kleine Nettoladung auf. Aufgrund der verschiedenen Angaben für den IP in der Literatur läßt sich die Migrationsreihenfolge nicht voraussagen, allerdings ist sicher, daß der EOF hauptsächlich zur effektiven Mobilität des Analyten beiträgt.

Bei der Meßreihe b-LAC-080505, bei der die Proteinlösung sterilfiltriert wird, beobachtet man eine starke Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) um 50% bzw. 160% (Abb. 5.38). Auffällig ist bei der Meßreihe, daß die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität in den ersten 20 Läufen erfolgt, während die RSD% aus den Läufen 21-30 weniger als 1,9% beträgt. Insgesamt fällt der Wert von 3,64 auf  $1,42 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  ab und ist ein eindeutiger Hinweis auf die Proteinadsorption. Bei dem als 2a bezeichneten Peak handelt es sich nicht um  $\beta$ -Lactoglobulin, sondern um eine Verunreinigung des Acetanilids, die bei  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werten  $> 2,5 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  auch in anderen Meßreihen detektiert wird. Das Protein läßt sich im Verlauf der gesamten Meßreihe nicht beobachten.

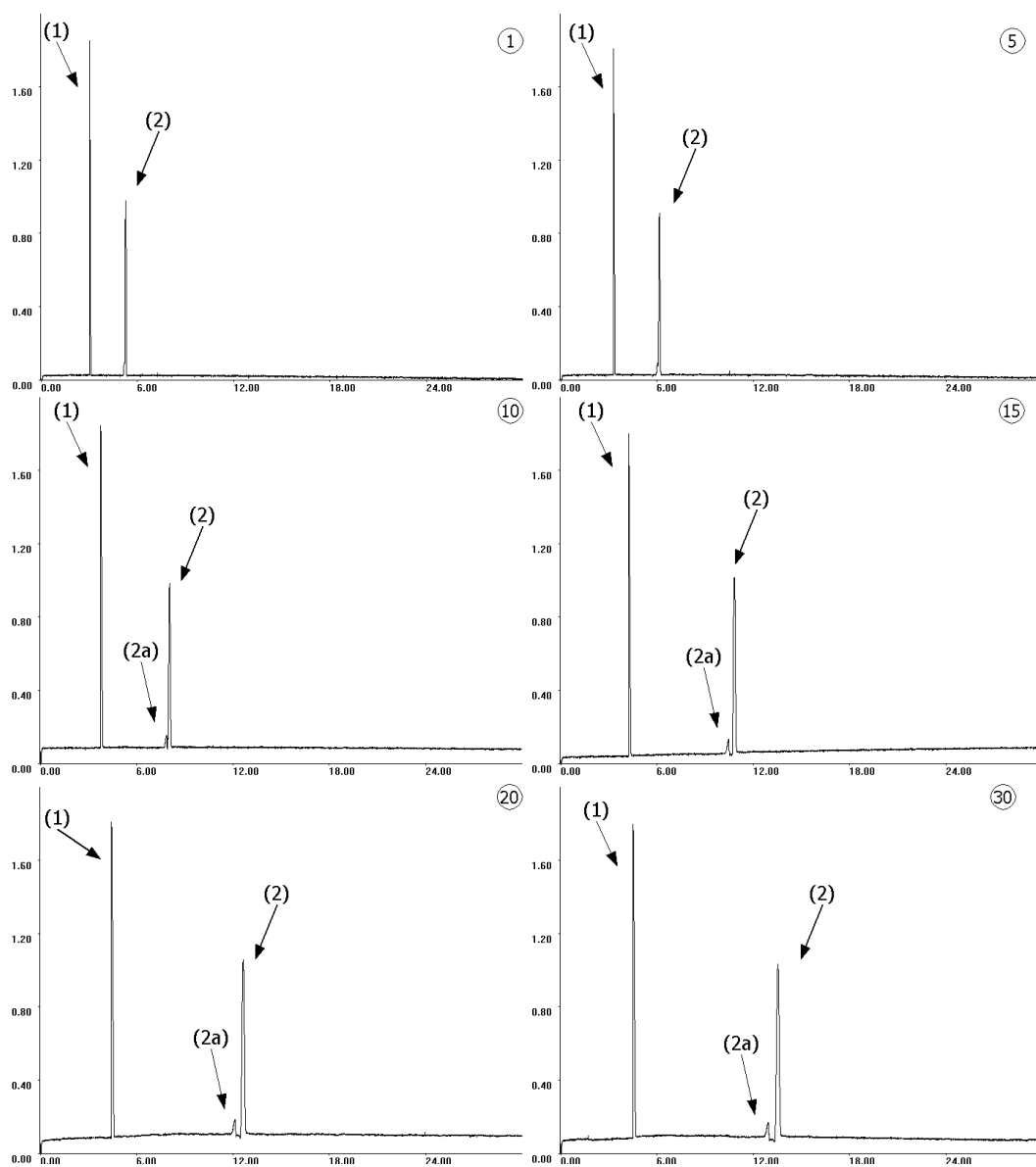


Abbildung 5.38:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 5$  ng pro Injektion; b-LAC-080505)  
 Acetat-Puffer pH 5,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 48 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin und (2) Acetanilid

Bei der statistischen Auswertung resultieren bei allen Meßgrößen erhebliche Schwankungen (vgl. Tab 5.5.1.1.2), wobei selbst die korr. AU-Werte davon betroffen sind. Diese streuen mit 5,3% vergleichsweise gering (vgl. Kap. 5.4.1).

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	10,186	9,101	11,271	3,032	29,762	9,19034
Fläche [AU·min]	Acetanilid	96,468	84,790	108,147	32,637	33,831	1065,14400
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	9,339	9,162	9,516	0,495	5,301	0,24513
EOF [ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	2,096	1,827	2,364	0,751	35,834	0,56396

Tabelle 5.5.1.1.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 5,0 EOF-Marker (b-LAC-080505)

Bei den abschließenden Kontrollläufen beobachtet man eine leichte Zunahme des EOF, wobei die RSD% mit 1,8% etwa so groß ist wie bei der ersten Kontrollreihe.



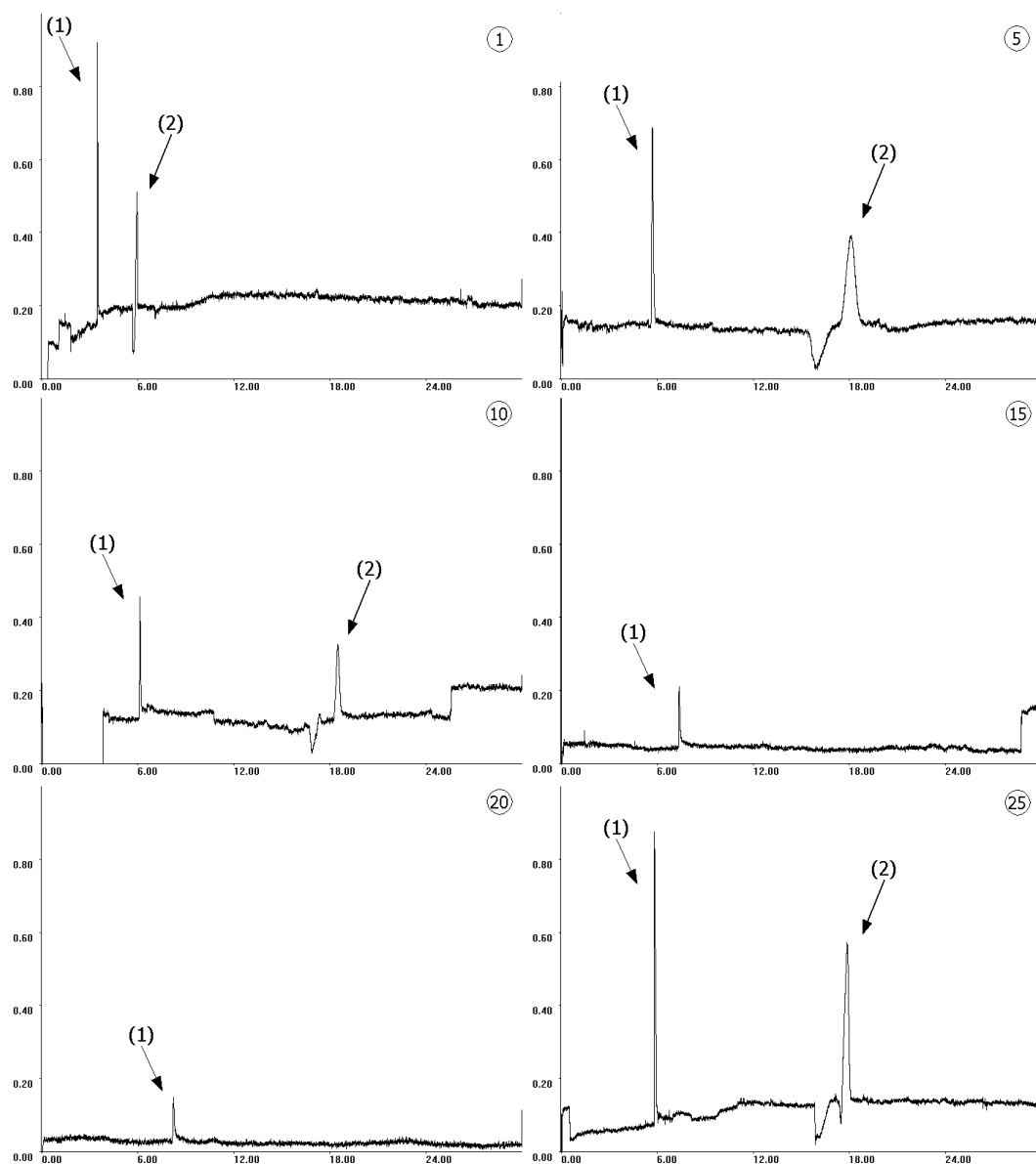


Abbildung 5.39:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; b-LAC-160403)  
 Acetat-Puffer pH 5,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 53 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 25  
 (1) N-Butylscopolaminium und (2) Acetanilid

Im Gegensatz zu dieser Meßreihe läßt sich selbst das Peakmuster kaum reproduzieren, wenn man darauf verzichtet, die  $\beta$ -Lactoglobulin-Lösung zu sterilfiltrieren (Abb. 5.39). Sowohl der EOF-Marker-Peak (2) als auch der des verwendeten N-Butylscopolaminiums (1) weisen extreme Schwankungen auf. Selbst die RSD%-Werte der korrigierten Flächen des internen Standards zeigen Abweichungen von 20%. Die Werte variieren bei Acetanilid sogar um 87% (s. Tab. 5.5.1.1.3). Die Probleme durch die Proteinadsorption führen dazu, daß der EOF-Marker nur in jedem zweiten Elektropherogramm im Zeitfenster von 30 min detektiert werden kann.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	18,436	14,125	22,747	7,619	41,328	58,05168
Fläche [AU·min]	Acetanilid	35,080	18,742	51,418	28,876	82,314	833,83570
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	2,589	1,321	3,857	2,241	86,567	5,02379
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,349	0,858	1,840	0,869	64,391	0,75453

Tabelle 5.5.1.1.3: keine Filtration, EOF-Marker pH 5,0 (b-LAC-160403)

### 5.5.1.2 Phosphat-Puffer - pH 6,0

Die Untersuchungen werden in einem 50 mM Phosphat-Puffer mit pH 6,0 durchgeführt. Die Untersuchung sollen klären, ob sich  $\beta$ -Lactoglobulin bei einem pH-Wert oberhalb des IP detektieren läßt und ob auch chromatographische Verteilungsprozesse hier relevant sind (vgl. Kap. 5.3.2 und 5.4.1.3). Um Bezugswerte für die wichtigsten Parameter zu erhalten, wird die Systempräzision kontrolliert (s. Kap. 5.2.1). Für beide Meßreihen sind die Ergebnisse von Acetanilid nachfolgend zusammengefaßt.

Systempräzision 1	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
mit Filtration	(b-LAC-161204)						
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,231	4,059	4,404	0,383	9,054	0,14677
Fläche [AU·min]	Acetanilid	41,318	39,591	43,044	3,840	9,293	14,74434
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	9,765	9,655	9,875	0,244	2,501	0,05964
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,572	4,391	4,752	0,401	8,782	0,16119
ohne Filtration	(b-LAC-170203)						
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,598	4,540	4,656	0,093	2,026	0,0087
Fläche [AU·min]	Acetanilid	10,986	10,569	11,402	0,672	6,118	0,4517
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	2,388	2,316	2,461	0,117	4,888	0,0136
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,177	4,125	4,230	0,085	2,044	0,0073

Tabelle 5.5.1.2.1: System-Test, pH 6,0 EOF-Marker

Die Meßreihe b-LAC-161204 zeigt, daß die elektroosmotische Mobilität und die davon abhängigen Größen Schwankungen unterliegen, die auf die Hysteresis der Prozesse in der inneren Helmholtz-Schicht zurückgeführt werden können (vgl. Kap. 1.5).

In den Untersuchungen der filtrierten Proteinlösung fallen neben einer Abnahme des EOF einige unerwartete Beobachtungen auf (s. Abb. 5.40). Dazu gehört, daß der  $\beta$ -Lactoglobulin-Peak (3) zwischen denen von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) liegt. Dies läßt die Hypothese zu, daß das Protein positiv geladen ist, was aber im Widerspruch zu den Angaben des IP von 4,8-5,2 in der Literatur steht. Außerdem ist der Peak des  $\beta$ -Lactoglobulins in den Läufen 1-19 ungewöhnlich schmal und scharf begrenzt. Die Form ändert sich in den nachfolgenden Läufen abrupt und zudem nimmt die korrigierte Fläche von 8,9 (1-19) auf 22,2 (20-30) Einheiten zu. Noch verwunderlicher ist, daß  $\mu_{\text{app}}$  ( $\beta$ -Lactoglobulin) während der ersten 17 Läufe zunimmt und sich

zeitgleich zur Veränderung der Peakform stabilisiert. Diese Resultate sind konträr zum Verhalten des EOF-Markers, dessen Migrationsgeschwindigkeit stark abnimmt.

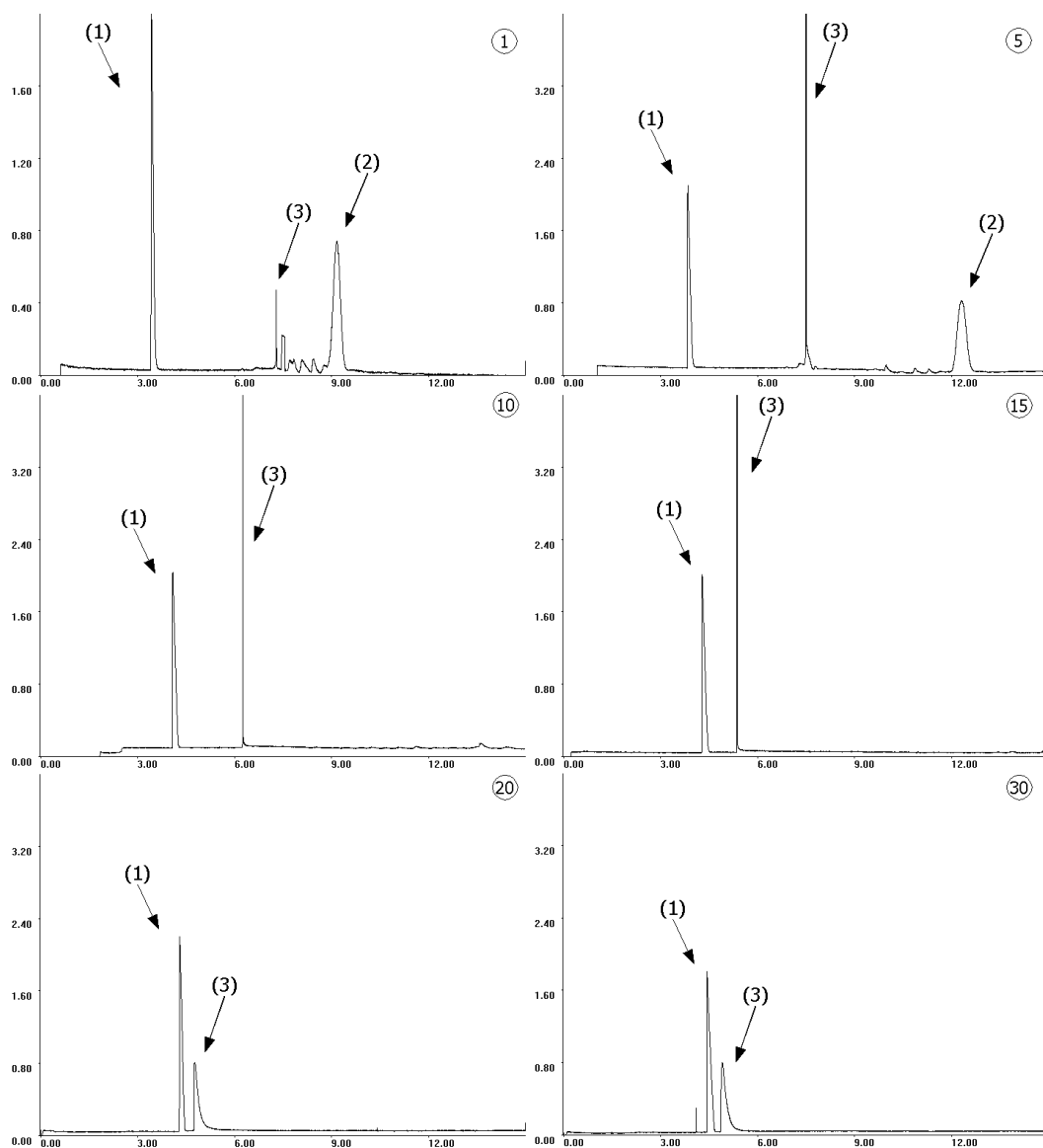


Abbildung 5.40:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 5$  ng pro Injektion; b-LAC-161204)  
Phosphat-Puffer pH 6,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 46 \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Nach 6 Läufen läßt sich Acetanilid sogar nicht mehr innerhalb des Zeitfensters von 15 min detektieren. Im Unterschied dazu schwanken die Migrationszeiten des internen Standards nur um 6,2% und die korrigierten Flächen lediglich um 3,8%. Die in Tab. 5.5.1.2.2 angegebenen Werte basieren auf lediglich sechs Messungen und sind daher keinesfalls repräsentativ für die gesamte Meßreihe.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	11,216	9,799	12,632	1,770	15,783	3,13379
Fläche [AU·min]	Acetanilid	157,382	131,711	183,052	32,082	20,385	1029,23192
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	13,972	13,126	14,817	1,057	7,567	1,11760
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,746	1,534	1,959	0,265	15,187	0,07035

Tabelle 5.5.1.2.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 EOF-Marker (b-LAC-161204)

Für die Berechnung der Resultate gehen im Fall des Proteins insgesamt 30 Datensätze ein, so daß die Schwankungen und RSD%-Werte repräsentativer für die Probleme unter den Bedingungen bei pH 6,0 sind.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	5,760	5,351	6,170	1,125	19,532	1,26578
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	71,617	61,681	81,553	27,301	38,121	745,32936
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	13,193	10,947	15,439	6,172	46,779	38,08750

Tabelle 5.5.1.2.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 (b-LAC-161204)

Bei der zweiten Kontrollreihe schwanken die Meßwerte ebenfalls sehr deutlich. Die elektroosmotische Mobilität zeigt ein sehr merkwürdiges Verhalten, da sie von  $2,26 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (1. Lauf) auf  $3,32 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (6. Lauf) ansteigt, um dann unter  $2,0 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Lauf 20) abzufallen.

Bei den Untersuchungen mit der nicht filtrierten Probenlösung wird anstelle von Neostigmin Melamin als interner Standard (1) verwendet. Die Verwendung einer anderen Bezugssubstanz geschieht aus zwei Gründen. Einerseits besitzen sowohl Bromid-Ionen als auch quartäre Ammoniumverbindungen chaotrope Eigenschaften, welche die Stabilität der Proteinstruktur herabsetzen können. Andererseits ist die Mobilität von Melamin geringer, so daß die Auswertung der über die Verhältnisse der korrigierten Peakflächen möglicherweise zu Verbesserungen führt. Als EOF-Marker wird weiterhin Acetanilid verwendet (2).

Wie durch die Elektropherogramme in Abb. 5.41 belegt wird, treten auch bei dieser Versuchsreihe Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit auf. Man erkennt zunächst die deutliche Zunahme der Migrationszeiten, von der alle Analysenbestandteile betroffen sind. Die Migrationsreihenfolge entspricht bei dieser Versuchsreihe den Erwartungen, da das negativ geladene Protein das Detektionsfenster nach Melamin und Acetanilid passiert. Die Peakform des  $\beta$ -Lactoglobulins verändert sich im Verlauf der Messungen mehrfach. Zu Beginn erkennt man einen flachen, langgezogenen Peak. Ab dem 8. Lauf weist der Peak jedoch zwei Maxima auf, deren Abstand zueinander sich immer mehr vergrößert. Ab dem 18. Lauf sind die zugehörigen Fraktionen Basis-

linien getrennt, allerdings läßt sich ab dem 20. Lauf nur noch die basischere der beiden Formen mit der geringeren effektiven Mobilität detektieren. In den letzten beiden Elektropherogrammen der Meßreihe beobachtet man nur noch einen schmalen, scharf abgegrenzten Peak, der vermutlich auf die Bildung von Protein-Aggregaten zurückzuführen ist. Bei der Integration der Substanz-Peaks wird die Auswertung des EOF-Markers dadurch erschwert, daß zu Beginn keine gute Trennung gegenüber Melamin erreicht wird, da ein weiterer Peak zwischen diesen den Substanzen liegt.

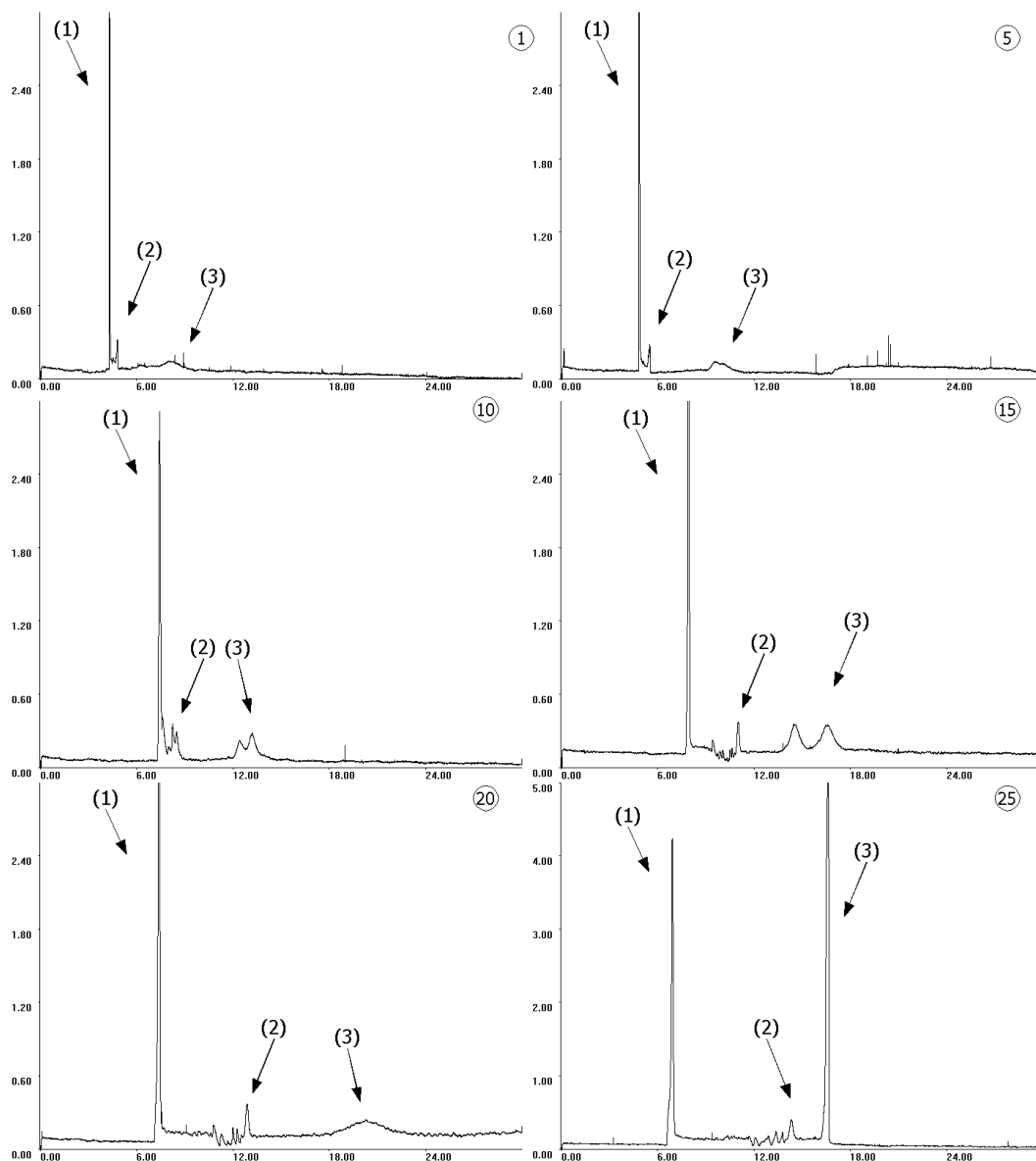


Abbildung 5.41:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; b-LAC-170203)  
Phosphat-Puffer pH 6,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 53 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 25  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Ab dem 11. Lauf nimmt die Migrationszeit von Melamin nicht mehr zu. Die Trennung der beiden Substanzen verbessert sich, da die Migrationszeiten von Acetanilid weiter zunehmen. Gleichzeitig treten immer mehr Störpeaks durch Degradationsprodukte

des  $\beta$ -Lactoglobulin auf, die ihrerseits die Integration behindern. Die statistische Auswertung von Acetanilid ist in Tab. 5.5.1.2.4 zusammengefaßt. Die elektroosmotische Mobilität nimmt von  $4,0 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  um etwa 2/3 auf dann  $1,34 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  ab.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	9,646	8,347	10,946	3,314	34,354	10,9824
Fläche [AU·min]	Acetanilid	20,317	17,853	22,781	6,286	30,939	39,5144
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	2,208	1,997	2,419	0,538	24,378	1,2897
EOF [ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	2,283	1,340	3,997	0,928	40,595	0,8610

Tabelle 5.5.1.2.4:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 EOF-Marker (b-LAC-170203)

Die Resultate des Proteins streuen ebenfalls sehr stark (s. Tab. 5.5.1.2.5). Anhand dieser Meßwerte und des Migrationsverhaltens der anderen Analyten muß auch bei dieser Meßreihe von einer stark ausgeprägten Proteinadsorption ausgegangen werden (s. Kap. 5.1.1).

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	14,260	12,007	16,514	5,012	35,146	25,1194
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	102,271	75,363	129,179	59,842	58,514	3581,0952
korrr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,045	5,558	8,533	3,309	46,962	10,9471

Tabelle 5.5.1.2.5:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 (b-LAC-170203)

### 5.5.1.3 Phosphat-Puffer - pH 6,5

Auch bei diesen Meßreihen wird ein 50 mM Phosphat-Puffer, pH 6,5 verwendet (vgl. Kap. 9.3.3 und 9.6.3). Bei diesem Wert wird der IP von  $\beta$ -Lactoglobulin um mindestens eine pH-Einheit überschritten, so daß das Protein eine merkliche negative Ladung ausweist. Damit nimmt auch die Tendenz zur Adsorption an der Kapillarwand theoretisch ab und sollte eine kapillarelektrophoretische Bestimmung ermöglichen. Zu Beginn beider Meßreihen werden die Kontrollläufe durchgeführt, um die Systempräzision zu bestimmen. Die Resultate des EOF-Markers sind in Tab. 5.5.1.3.1 nachfolgend zusammengefaßt.

Bei der Meßreihe, die mit der filtrierte Proteinlösung durchgeführt wird, kommt Neostigmin als interner Standard zum Einsatz (s. Kap. 9.6.3), während die unfiltrierte Probe Melamin enthält (s. Kap. 9.3.3). Vergleicht man die Resultate, fällt auf, daß in der Meßserie b-LAC-050403 große Schwankungen der Peakflächen auftreten. Diese sind auf Probleme mit dem Injektionssystem am Anfang der Messungen zurückzuführen. Die Migrationszeiten streuen innerhalb der für pH 6,5 üblichen Grenzen.

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
mit Filtration		(b-LAC-170205)						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,549	3,535	3,563	0,039	1,106	0,00154
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	46,657	46,180	47,135	1,335	2,860	1,78094
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	13,150	12,984	13,316	0,465	3,534	0,21595
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,411	5,389	5,432	0,060	1,107	0,00359
ohne Filtration		(b-LAC-050403)						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,308	4,198	4,417	0,167	3,878	0,02790
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	31,383	5,992	56,774	38,865	123,841	1510,47752
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,213	1,424	13,003	8,861	122,850	78,52556
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,463	4,353	4,573	0,168	3,764	0,02822

Tabelle 5.5.1.3.1: System-Test, pH 6,5 EOF-Marker

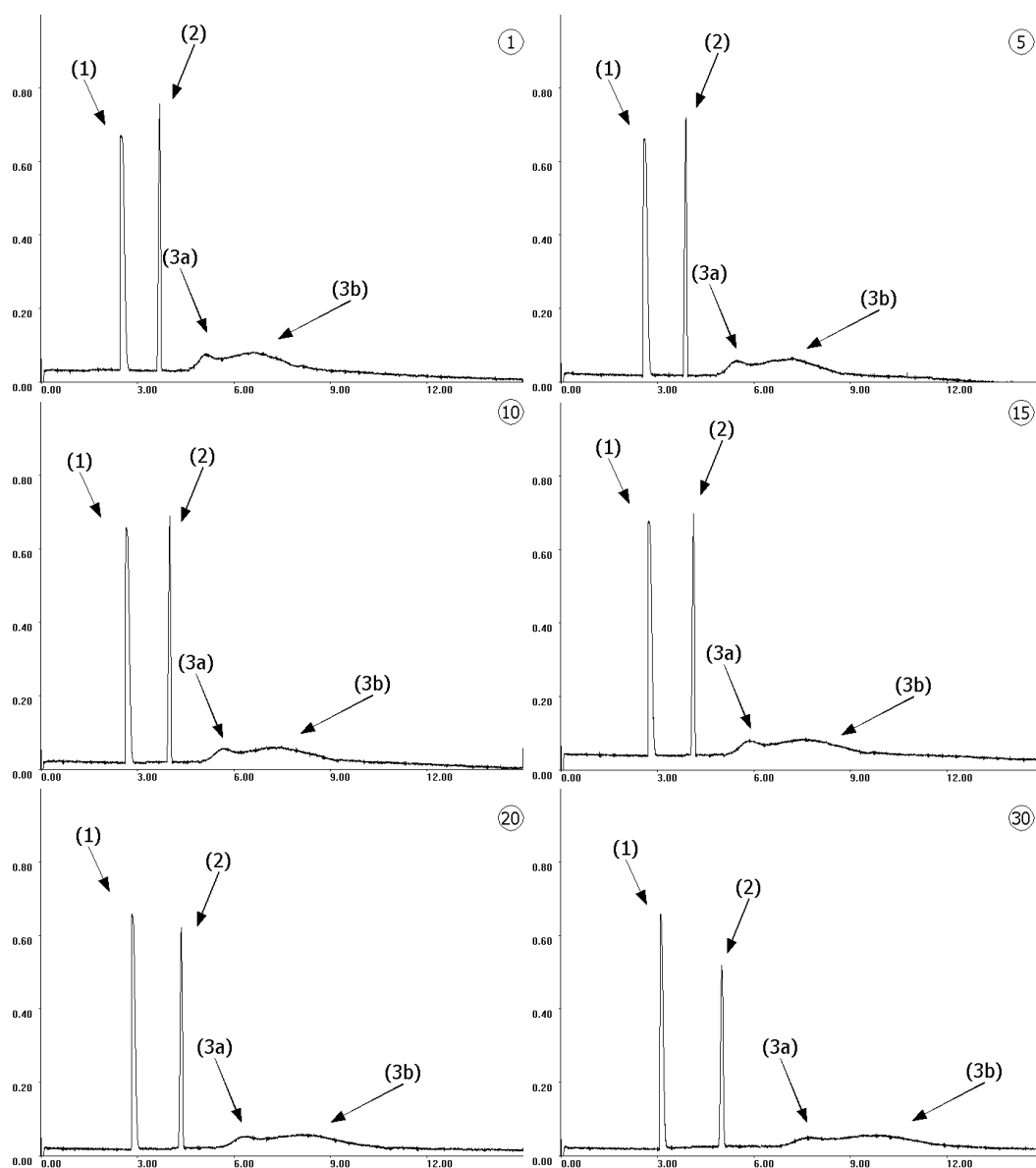


Abbildung 5.42:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; b-LAC-170205)  
 Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 46 \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

In Abb. 5.42 sind einige Elektropherogramme aus der Untersuchungsreihe mit der filtrierten Lösung zusammengefaßt. Die Migrationsreihenfolge der Analyten entspricht

den Erwartungen (s. Kap. 1.2.1). Auch bei pH 6,5 können die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) schlecht reproduziert werden, da die elektroosmotische Mobilität während der Messungen um 26% abnimmt bzw. von 5,2 auf  $3,8 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  abfällt. Weitaus wichtiger ist aber, daß die korr. AU-Werte stärker streuen als die Migrationszeiten.

Beim Vergleich der RSD%(korr. AU)-Werte des EOF-Markers aus Kontroll- und Meßserien (Tab. 5.5.1.3.1 und 5.5.1.3.2) stellt man fest, daß die RSD% von 17,2% während der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin nicht auf apparative Faktoren zurückzuführen ist. Die Vergleichswerte liegen vorher bei 3,5% bzw. nachher bei 6,6% und weisen auf Proben-immanente Ursachen hin. Berücksichtigt man, daß  $\beta$ -Lactoglobulin als proteinogener Emulgator verwendet wird [108], und somit auch die Viskosität der Lösungen herabsetzt, ist die Abnahme der korr. AU im Zusammenhang mit der Proteinlösung zu sehen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,305	4,142	4,468	0,455	10,566	0,20689
Fläche [AU·min]	Acetanilid	35,587	34,587	36,586	2,792	7,847	7,79787
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	8,412	7,893	8,931	1,450	17,238	2,10265
EOF [ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,506	4,344	4,668	0,453	10,054	0,20526

Tabelle 5.5.1.3.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 EOF-Marker (b-LAC-170205)

Da bei allen Komponenten dieser Effekt auftritt, muß von einer Abnahme des Injektionsvolumens ausgegangen werden. Diese kann entweder durch eine Temperaturabnahme oder eine Verminderung der oberflächenaktiven Proteinmenge ausgelöst werden. Im Fall von Temperatureinflüssen sollten die Quotienten aus den korr. AU-Werten konstante Werte annehmen, da sich die Zusammensetzung der Probe nicht ändert. Im vorliegenden Fall schwankt der Quotient aus Neostigmin- und Acetanilid-Werten um lediglich 1,09%. Bildet man hingegen die Quotienten korr. AU(Neostigmin)/ korr. AU( $\beta$ -Lactoglobulin) bzw. korr. AU(Acetanilid)/korr. AU( $\beta$ -Lactoglobulin), beträgt deren RSD% 21,3% bzw. 21,7%. Bei beiden Quotienten beobachtet man eine Zunahme, die darauf hinweist, daß die detektierte Proteinmenge in Relation zu den Vergleichssubstanzen deutlich stärker abnimmt. Daher liegt die Schlußfolgerung nahe, daß sich  $\beta$ -Lactoglobulin im Probengefäß entweder zersetzt oder an dessen Glaswand adsorbiert.



Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	8,014	7,577	8,452	1,223	15,263	1,49631
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	56,174	52,151	60,196	11,241	20,012	126,36610
corr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,338	6,512	8,164	2,308	31,449	5,32559

Tabelle 5.5.1.3.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (b-LAC-170205)

Außerdem fällt bei den Elektropherogrammen der Meßreihe auf, daß der Proteinpeak sehr breit und flach ist und zwei Maxima (3a und 3b) aufweist. Im Verlauf der Untersuchungen nimmt die Peakbreite weiter zu, was ein typisches Anzeichen für die Adsorption des Proteins an der Kapillarwand ist. Bei den abschließenden Kontrollversuchen konstatiert man bei den Peakflächen bzw. corr. Flächen kleinere Schwankungen, während die Migrationszeiten stabil bleiben. Aus diesem Grund kann angenom-

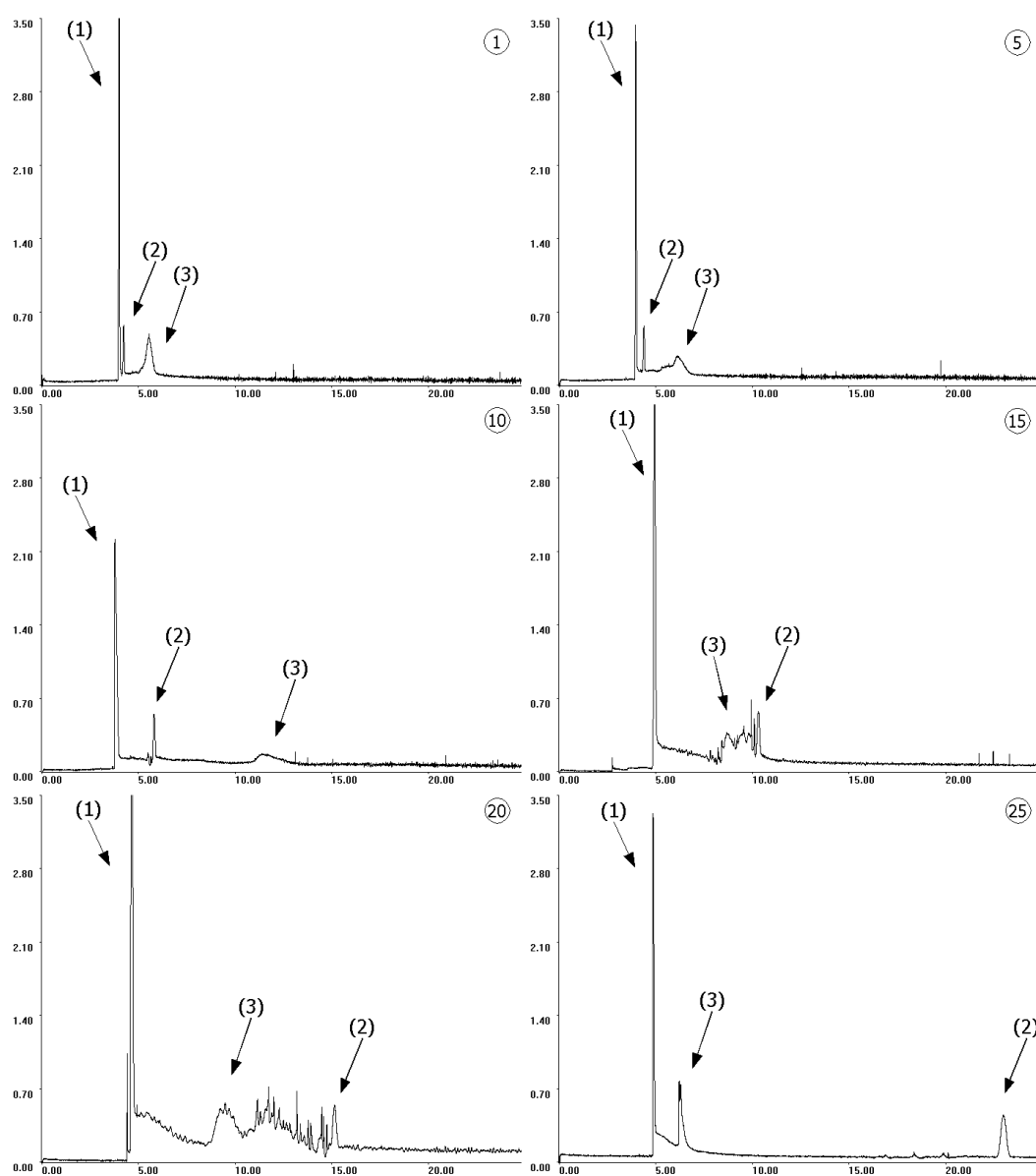


Abbildung 5.43:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; b-LAC-050403)  
 Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 72 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 25  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

men werden, daß es weder zu einer Desorption von Proteinplaques kommt, noch daß sich die Adsorbate durch Alterungsprozesse weiter verändern.

Auch bei der Untersuchung der nicht filtrierten  $\beta$ -Lactoglobulin-Lösung erkennt man die Probleme bei der Reproduzierbarkeit von Meßergebnissen bereits in den Elektropherogrammen (Abb. 5.43). Während in den ersten zehn Läufen die Migrationsreihenfolge mit den Ergebnissen der anderen Versuchsreihe übereinstimmt, treten ab dem 11. Lauf massive Veränderungen des Peakmusters auf. An die Stelle des breiter werdenden Proteinpeaks (3) treten nun Peakcluster, deren Migrationsgeschwindigkeiten größer sind als die des EOF-Markers (2). In den letzten fünf Läufen der Untersuchungsreihe erkennt man einen relativ klar begrenzten Proteinpeak, dessen Migrationsgeschwindigkeit fast den Wert des internen Standards Melamin (1) erreicht.

Allerdings sind beide Peaks nicht Basislinien-getrennt. Vielmehr weist der Melamin-Peak ein deutliches Tailing auf, das sonst nicht beobachtet wird. Vermutlich handelt es sich um eine Überlagerung mit einem zweiten Proteinpeak, da auch die korrigierte Fläche bei diesen Läufen deutlich größer ist als bei den vorausgegangenen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	5,388	4,860	5,917	1,111	20,623	1,23484
Fläche [AU·min]	Acetanilid	42,703	31,518	53,887	23,528	55,098	553,58258
corr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,595	6,047	9,143	3,257	42,883	10,60767
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,696	3,365	4,028	0,697	18,853	0,48567

Tabelle 5.5.1.3.4:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 EOF-Marker (b-LAC-050403)

Die in Tabelle 5.5.1.3.4 angegebenen Werte beziehen sich auf die ersten fünf Läufe der Untersuchungen, da im weiteren Versuchsverlauf die Peaks nicht mehr sinnvoll integrieren lassen. Darüber hinaus lassen sich aus den Resultaten der statistischen Auswertung (Tab. 5.5.1.3.5) keine zusätzlichen Informationen gewinnen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	5,781	5,565	5,997	0,246	4,263	0,06073
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	37,676	20,018	55,334	20,146	53,470	405,84519
corr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	6,641	3,366	9,916	3,736	56,258	13,95844

Tabelle 5.5.1.3.5:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (b-LAC-050403)

Anhand der Peakmuster muß geschlußfolgert werden, daß es während der Untersuchung verschiedenen Komplikationen aufgetreten sind. Neben der Proteinadsorption scheinen sich Agglomerate zu bilden, die teilweise von der Kapillarwand desorbiert werden. Außerdem muß von Abbauprozessen ausgegangen werden [23], da in den letzten Elektropherogrammen zahlreiche, kleine Spikes vorkommen.

### 5.5.1.4 Phosphat-Puffer - pH 7,0

Für die Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin bei pH 7,0 wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet (vgl. Kap. 9.3.4 und 9.6.4). Bei den System-Tests zeigt sich, daß nur geringe Schwankungen bei den Migrationszeiten und der elektroosmotischen Mobilität auftreten. Die deutlich größeren Schwankungen bei den Flächen und korr. Flächen lassen sich auf Probleme mit dem Injektionssystem zurückzuführen. Die Flächenquotienten weisen geringere Abweichungen auf, die unter 0,86% liegen.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	3,269	3,253	3,284	0,043	1,330	0,00189
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	41,380	40,868	41,891	1,429	3,454	2,04316
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	12,659	12,526	12,792	0,372	2,937	0,13827
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	5,875	5,848	5,903	0,077	1,308	0,00590

Tabelle 5.5.1.4.1: System-Test, pH 7,0 EOF-Marker (b-LAC-150205)

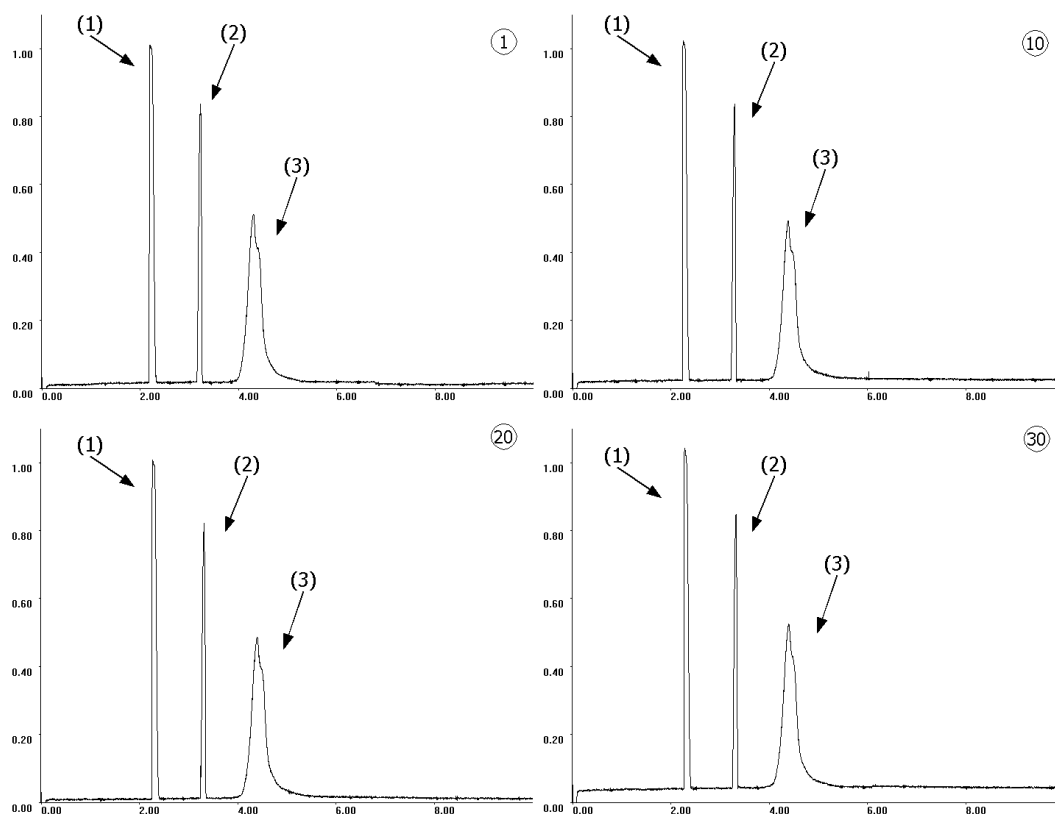


Abbildung 5.44:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; b-LAC-150205)  
Phosphat-Puffer pH 7,0 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I  $\sim 62$   $\mu$ A; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

In Abb. 5.44 sind einige Elektropherogramme aus der Untersuchungsreihe mit der filtrierten Proteinlösung zusammengestellt. Anhand der abgebildeten Läufe lassen sich die signifikanten Unterschiede zu den Messungen bei pH 6,5 aufzeigen. Der  $\beta$ -Lactoglobulin-Peak (3) ist deutlich höher und schmaler als beispielsweise bei pH 6,5. Er

weist auf der rechten Seite eine reproduzierbare, wenn auch schwach ausgeprägte Schulter auf. Innerhalb der Versuchsreihe streuen die Werte der Migrationszeiten und der elektroosmotischen Mobilität nur unwesentlich. Die Schwankungen liegen im Bereich zwischen 0,97% für  $\beta$ -Lactoglobulin und 1,42% bei Neostigmin (1). Die Abweichungen bei den Peakflächen und korrigierten Flächen (Tab. 5.5.1.4.2) sind auf Injektionsfehler zurückzuführen. Durch die Bildung der Flächenquotienten von Acetanilid und Neostigmin reduziert sich die RSD% auf 0,86%.

<b>b-LAC-150205</b>		<b>Substanz</b>	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	<b>RSD %</b>	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,290	3,276	3,304	0,039	1,197	0,00155
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	37,482	37,000	37,963	1,345	3,588	1,80880
corr. Fläche	[AU]	Acetanilid	11,395	11,234	11,556	0,450	3,946	0,20217
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,837	5,811	5,862	0,071	1,212	0,00501
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	4,366	4,350	4,381	0,042	0,972	0,00180
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	109,386	107,409	111,362	5,523	5,050	30,50852
corr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	25,062	24,571	25,554	1,373	5,478	1,88504

Tabelle 5.5.1.4.2:  $\beta$ -Lactoglobulin-Untersuchung, pH 7,0 (b-LAC-150205)

Im Fall von Acetanilid und  $\beta$ -Lactoglobulin sinkt die RSD% unter 4,0%. Berücksichtigt man, daß bei Lauf 21 ein durch einen Fehler in der Datenaufnahme bedingter Ausreißer vorliegt, nimmt die Schwankung der relativen Flächen auf 1,5% RSD% ab. Bei den Kontrollversuchen, die im Anschluß an die Proteinbestimmung durchgeführt werden, beobachtet man ebenfalls das Phänomen, daß die Werte für die Peakflächen mehr streuen als bei  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  ( $>1,30\%$ ). Die Schwankungen lassen sich durch die Verwendung der Flächenquotienten auf RSD%-Werte von 0,92% reduzieren.

In der Versuchsreihe, bei der auf die Sterilfiltration der  $\beta$ -Lactoglobulin-Lösung verzichtet wird, ergeben sich einige Unterschiede im Vergleich zur Meßreihe b-LAC-150205. Die betrifft vorrangig das Peakmuster der Elektropherogramme (Abb. 5.45).

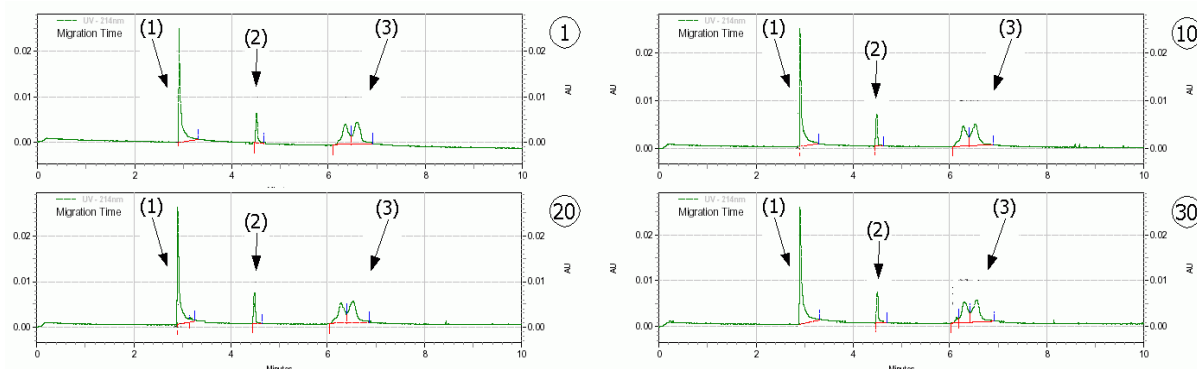


Abbildung 5.45:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; b-LAC-050403)  
Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=28 \text{ kV}$ ,  $I \sim 86 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,501	4,492	4,510	0,025	0,550	0,00061
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	37,809	37,301	38,317	1,419	3,752	2,01266
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,000	6,905	7,096	0,266	3,802	0,07083
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,266	4,258	4,274	0,023	0,540	0,00053
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin 1	6,299	6,283	6,315	0,045	0,716	0,00204
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin 1	76,763	75,728	77,798	2,892	3,767	8,36230
korrr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin 1	10,157	10,016	10,298	0,395	3,885	0,15567
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin 2	6,538	6,514	6,562	0,067	1,030	0,00453
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin 2	89,589	87,934	91,244	4,624	5,162	21,38558
korrr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin 2	11,419	11,214	11,623	0,571	5,001	0,32612

Tabelle 5.5.1.4.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 7,0 nicht filtrierte Lösung (b-LAC-170103)

Der offensichtlichste Unterschied betrifft die Peakform des Proteins (3). Im Gegensatz zu Abb. 5.45 besteht der  $\beta$ -Lactoglobulin-Peak aus zwei Fraktionen. Bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse fällt auf, daß die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und dem Protein unter 0,72% RSD% liegen. Wie auch bei der Meßserie b-LAC-150205 schwanken hingegen die Werte der Flächen und korrigierten Peakflächen mit 3,6% bis 6,5% wesentlich mehr. Im Gegensatz zu der Meßreihe mit filtrierter Lösung lassen sich die Abweichungen in dieser Serie nicht signifikant durch die Flächenquotienten reduzieren (vgl. Tab. 5.5.1.4.3). Die deutlichen Unterschiede bei den Mittelwerten von  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  sind darauf zurückzuführen (Tab. 5.5.1.4.2 und 5.5.1.4.4), daß zwei verschiedene Gerätetypen verwendet worden sind, die sich durch die Thermostatisierung der Kapillare unterscheiden. Da die Effizienz von Flüssigkeitskühlung höher ist als die von luftgekühlten Systemen, wird die Wärme bei letztgenannten schlechter abgeleitet. Durch die Erwärmung nimmt die Viskosität ab und bedingt höhere Migrationsgeschwindigkeiten.

### 5.5.1.5 Phosphat-Puffer - pH 8

Für die Messungen wird ein 50 mM Phosphat-Puffer, pH 8,0, verwendet (vgl. Kap. 9.6.5). Durch die Untersuchungen soll geklärt werden, ob sich die in der Literatur beschriebene Stabilitätsabnahme der Tertiär- und Quartärstruktur unter alkalischen Bedingungen [132] auch in der Kapillarelektrophorese auswirkt. Zusätzlich soll geprüft werden, ob sich die Verwendung von Phosphat-Puffern ähnlich auswirkt wie bei den Untersuchungen der Catalase (vgl. Kap. 5.4.2).

Die Ergebnisse des System-Tests sind in der nachfolgenden Tabelle 5.5.1.5.1 für den EOF-Marker zusammengefaßt, wobei alle Werte um weniger als 1% RSD% streuen.

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,871	2,864	2,878	0,019	0,678	0,00038
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	34,283	34,193	34,373	0,251	0,733	0,06323
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid	11,940	11,906	11,974	0,095	0,797	0,00906
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,687	6,671	6,703	0,045	0,677	0,00205

Tabelle 5.5.1.5.1: System-Test, pH 8,0 EOF-Marker (b-LAC-160205)

Die in Abb. 5.46 gezeigten Elektropherogramme belegen die gute Reproduzierbarkeit des Peakmusters und der Migrationszeiten bei der Verwendung der filtrierten Proteinlösung. Im Unterschied zu pH 7,0 weist der  $\beta$ -Lactoglobulin-Peak (3) jetzt zwei deutlich erkennbare Maxima auf. Diese Beobachtung ist deshalb hervorzuheben, da die elektroosmotische Mobilität bei dieser Meßreihe mit  $6,62 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  größer ist als bei pH 7,0. Im Gegensatz zu pH 7,0 existieren zwei Proteinfractionen nebeneinander mit unterscheidbaren Ladungs-/Radius-Verhältnissen. Lägen diese bereits bei pH 7,0 vor, würden diese deutlich voneinander getrennt werden, da die Trennleistung anti-proportional zur Migrationsgeschwindigkeit ist (vgl. Gl. 26, Kap. 5.3.1).

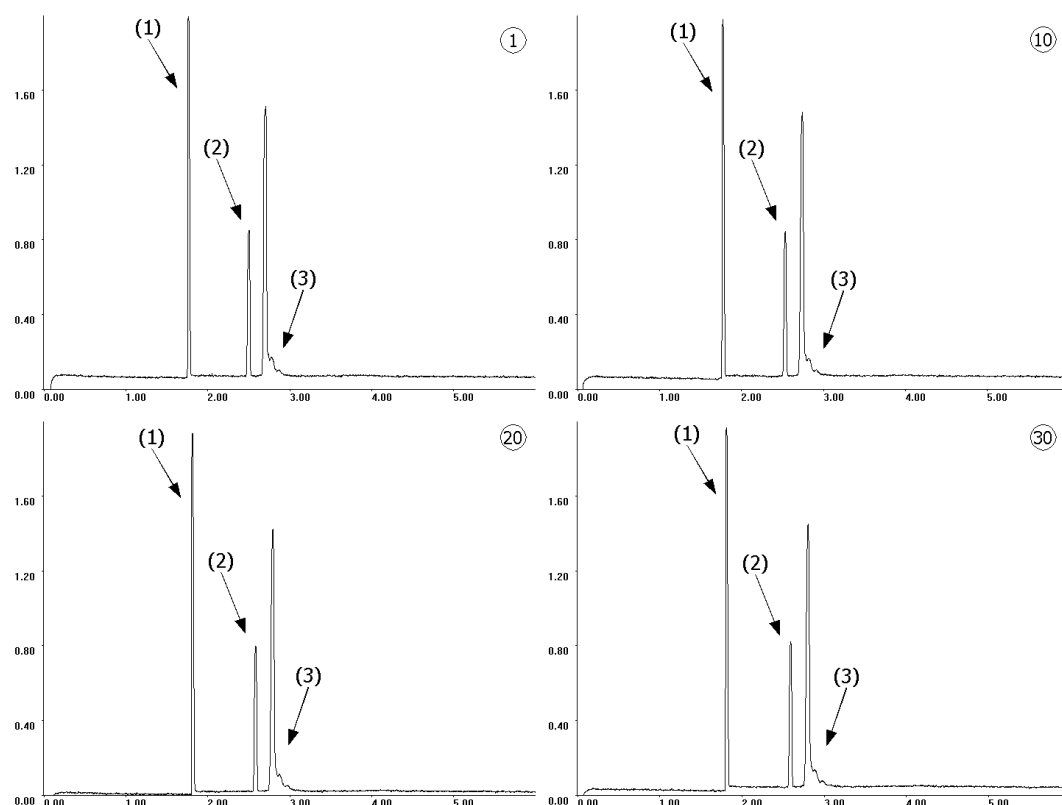


Abbildung 5.46:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 5 \text{ ng}$  pro Injektion; b-LAC-150205)  
 Phosphat-Puffer pH 8,0  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 84 \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Das Auftreten von unterschiedlich schnell migrierenden Proteinfractionen ist auf verschiedene Phänomene zurückzuführen (Tanford-Übergang, Dissoziation der Dimere).

Auf diese Problematik wird bei der Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 5.5.2 noch eingegangen werden.

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	4,020	4,003	4,036	0,046	1,139	0,00210
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	74,250	73,326	75,173	2,582	3,477	6,66507
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	18,479	18,194	18,764	0,796	4,309	0,63403

Tabelle 5.5.1.5.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 8,0 (b-LAC-160205)

Die statistische Auswertung zeigt (Tab. 5.5.1.5.2), daß die Flächen bei dem Protein-Peak stärker schwanken als bei Acetanilid (2, Tab. 5.5.1.5.3) oder Neostigmin (1). Ursache hierfür sind nicht Probleme des Injektionssystems sondern Integrationsfehler, die durch das Peak-Tailing verursacht werden. Die relevanten Meßgrößen der Bezugssubstanzen streuen während der Proteinuntersuchung mit RSD%-Werten von bis zu 1,9% mehr als beim System-Test, sind aber im Vergleich zu den Resultaten in schwach sauren Lösungen wesentlich besser.

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,902	2,886	2,917	0,043	1,472	0,00182
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	31,378	31,276	31,480	0,285	0,907	0,08106
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	10,816	10,743	10,889	0,204	1,884	0,04151
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,618	6,583	6,653	0,098	1,475	0,00953

Tabelle 5.5.1.5.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 8,0 EOF-Marker (b-LAC-160205)

Bei der abschließenden Kontrollreihe nehmen die RSD% aller Größen auf 1% oder weniger ab, allerdings bleibt der EOF um 4% vermindert im Vergleich zu den Ausgangswerten. Daher läßt sich schlußfolgern, daß auch bei pH 8,0 eine Adsorption des Proteins auftritt, diese beeinträchtigt die analytische Leistungsfähigkeit der Methode aber nur unbedeutend.

### 5.5.1.6 Borat-Puffer – pH 8,4

Die Ergebnisse bei der Untersuchung von boviner Catalase bei pH 9,2 (Kap. 5.4.2) zeigen, daß die Pufferionen die Proteinstruktur und damit auch das elektrophoretische Verhalten beeinflussen. Durch eine weitere Meßreihe bei pH 8,4 (120 mM Borat-Puffer, vgl. Kap. 9.3.6) soll geklärt werden, ob dieses Phänomen bei  $\beta$ -Lactoglobulin ebenfalls beobachtet werden kann und ob weitere Peak-Maxima auftreten. Darüber hinaus wird die Proteinlösung nicht steril filtriert, um mögliche Unterschiede zur Meßreihe b-LAC-160205 beobachten zu können. Die vollständigen Angaben zu den verwendeten Lösungen und Ergebnissen sind in Kapitel 9.3.6 zusammengestellt. Bei

der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin soll gleichzeitig geklärt werden, ob sich in Gegenwart des Proteins die Peakform der komigrierenden Marker Melamin und Acetanilid verändert.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	2,284	2,282	2,287	0,007	0,297	0,00005
Fläche [AU·min]	Melamin	144,697	144,029	145,366	1,868	1,291	3,48919
korr. Fläche [AU]	Melamin	63,343	63,061	63,626	0,790	1,247	0,62378
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	8,405	8,396	8,414	0,025	0,296	0,00062

Tabelle 5.5.1.6.1:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 8,4 (b-LAC-020103)

Die statistische Auswertung zeigt die gute Reproduzierbarkeit der relevanten Größen  $t_{\text{Mig}}$ ,  $\mu_{\text{EOF}}$ , AU und korr. AU (vgl. Tab. 5.5.1.6.1). Die Meßwerte schwanken bei den Vergleichssubstanzen geringfügig, wobei die Stabilität der elektroosmotischen Mobilität hervorzuheben ist. In Abb. 5.47 sind einige Elektropherogramme der Meßreihe zusammengestellt, welche die Wiederholbarkeit der Messungen graphisch belegt.

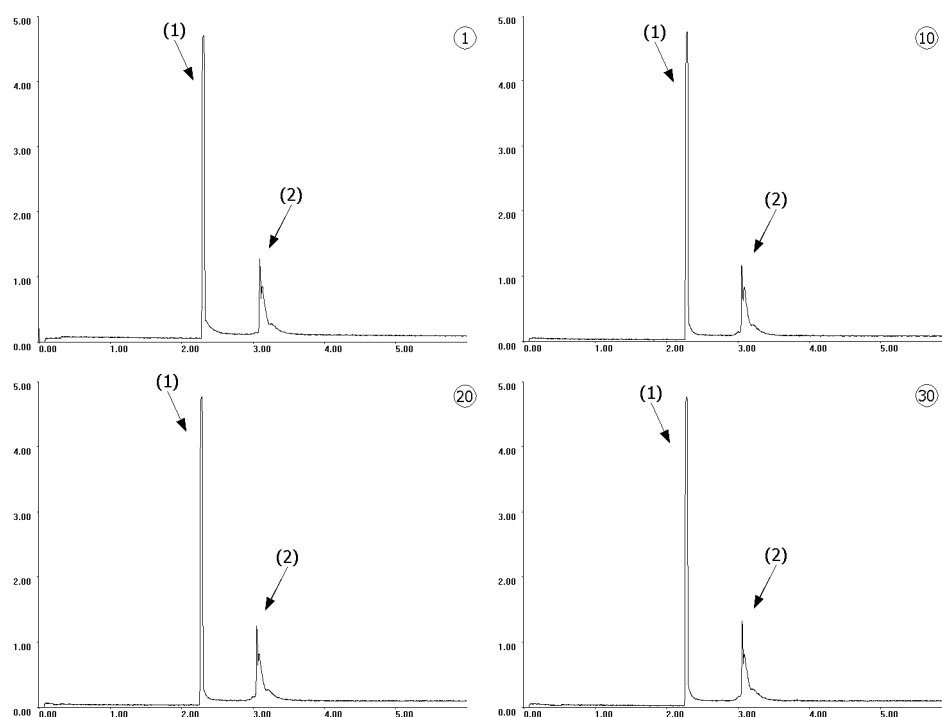


Abbildung 5.47:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 9$  ng pro Injektion; b-LAC-020103)  
Borat-Puffer pH 8,4,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 37 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Melamin/Acetanilid und (2)  $\beta$ -Lactoglobulin

Die Meßwerte streuen bei  $\beta$ -Lactoglobulin uneinheitlich: während die Migrationszeit eine RSD% von 0,38% aufweist, liegen die Werte für Flächen bzw. korrigierte Flächen bei 2,34% respektive 2,52% (Tab. 5.5.1.6.2). Bei genauerer Betrachtung der Werte läßt sich die Ursache schnell klären. Während die Peakgrenzen von der Integrationssoftware bei allen Elektropherogrammen gleich gesetzt werden, sind die Flä-



chenwerte bei den ersten beiden Läufen kleiner. Diese Tatsache weist darauf hin, daß eine Proteinadsorption erfolgt, diese aber bereits nach den ersten beide Läufe abgeschlossen ist, zumal die RSD% für beide Parameter für die restlichen Läufe 3-30 auf unter 1,3% sinkt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	β-Lactoglobulin	3,048	3,044	3,052	0,012	0,381	0,00013
Fläche [AU·min]	β-Lactoglobulin	66,491	65,933	67,048	1,559	2,344	2,42963
korr. Fläche [AU]	β-Lactoglobulin	21,817	21,621	22,014	0,549	2,515	0,30113

Tabelle 5.5.1.6.2: β-Lactoglobulin, pH 8,4 (b-LAC-020103)

Die Form des β-Lactoglobulin-Peaks ist bei pH 8,4 vergleichsweise schmal bezogen auf die Ergebnisse bei pH 8,0 und pH 9,2 (Kap. 5.5.1.7), weist aber ebenfalls zwei Maxima auf. Ein Grund für geringere Peakbreite ist die deutlich höhere elektroomotische Mobilität bei pH 8,4. Selbst wenn man den Quotienten aus Peakbreite und Migrationszeit als Vergleichsgröße verwendet, bleibt die der Peak bei pH 8,4 schmäler als bei pH 8,0. Außerdem unterscheiden sich der Peakhöhen beider Maxima im Vergleich zum Phosphat-Puffer. Alle Beobachtungen zusammengenommen weisen darauf hin, daß die Zusammensetzung der Elektrolytlösung im Fall des β-Lactoglobulins die Reproduzierbarkeit nicht beeinflußt. Man beobachtet eine Veränderung der Peakform, die gleichermaßen auf den pH-Wert als auf den Puffer zurückzuführen ist.

### 5.5.1.7 Borat-Puffer - pH 9,2

Aus Literaturangaben [132] ist zu entnehmen, daß die Entfaltungsenthalpie von β-Lactoglobulin bei pH 9,0 0 kJ·mol<sup>-1</sup> beträgt, d.h., daß die Denaturierung des Proteins bei Raumtemperatur spontan erfolgt. Daher ist die Fragestellung zu beantworten, ob sich die fehlende strukturelle Stabilität negativ auf die kapillarelektrophoretische Analytik auswirkt. Die Untersuchungen werden in einem 100 mM Borat-Puffer, pH 9,2 durchgeführt (ausführliche Angaben s. Kap. 9.6.6). Zusätzlich wird die Proteinlösung vor Gebrauch sterilfiltriert.

Vor der Untersuchung von β-Lactoglobulin wird zunächst die Systemstabilität untersucht. Die Ergebnisse für den EOF-Marker sind in Tab. 5.5.1.7.1 dargestellt. Bei den Werten fällt auf, daß die Migrationszeiten weniger streuen als die Peakflächen. Auch beim internen Standard beobachtet man dieses Problem, so daß es vorteilhaft ist, die relativen Flächenwerte zu vergleichen. Durch diese Maßnahme können die betreffen-

den RSD%-Werte auf unter 0,86% reduziert werden und somit den Einfluß des Injektionssystems eliminieren. Insgesamt liegt ein stabiles analytisches System vor.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,813	2,807	2,819	0,018	0,629	0,00031
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	30,658	30,436	30,880	0,620	2,023	0,38467
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	10,898	10,836	10,960	0,174	1,600	0,03040
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,826	6,810	6,841	0,043	0,628	0,00183

Tabelle 5.5.1.7.1: System-Test, pH 9,2 EOF-Marker (b-LAC-101204)

Im Anschluß wird die Untersuchung der Proteinlösung durchgeführt. Als EOF-Marker fungiert Acetanilid (2), während Neostigmin (1) als interner Standard eingesetzt wird. Einige der Elektropherogramme sind nachfolgend abgebildet (Abb. 5.48). Die Läufe zeigen keine Abweichungen von der erwarteten Migrationsreihenfolge. Vielmehr ist die Form des  $\beta$ -Lactoglobulin-Peaks bemerkenswert, da sich zwei Fraktionen überlagern. Zusätzlich tritt auf der abfallenden Seite eine ausgeprägte Schulter auf.

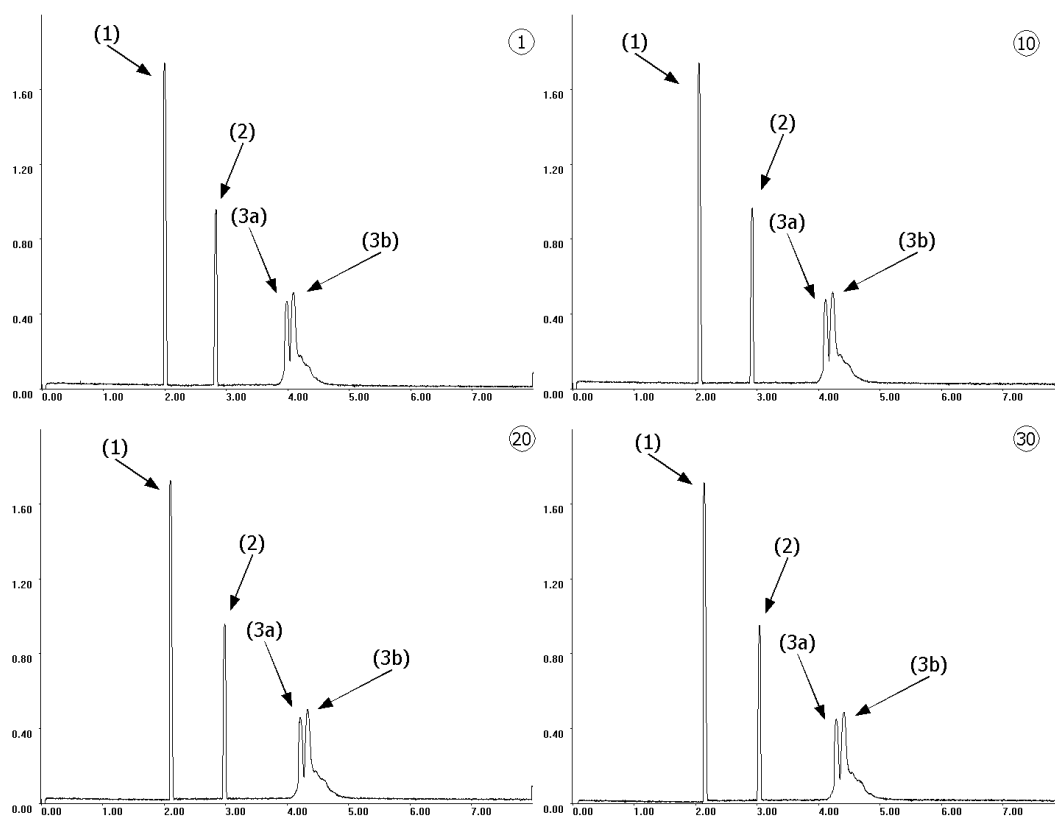


Abbildung 5.48:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; b-LAC-101204)  
Borat-Puffer pH 9,2  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 39 \mu\text{A}$ ; v.l.n.r. Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Um klären zu können, wie viele Peaks sich überlagern, müßte man eine Dekonvolution des Proteinpeaks vornehmen. Um die entsprechenden mathematischen Operationen anwenden zu können, müßte die Symmetrie der sich überlagernden Signale festgelegt werden, die aber nicht bekannt ist.

Bei der statistischen Auswertung der Meßdaten fällt auf, daß die Streuung der Migrationszeiten größer ist als die der Flächen, während die korr. AU-Werte ähnlich vom Mittelwert abweichen wie die Migrationszeiten (vgl. Tab. 5.5.1.7.2).

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,955	2,929	2,981	0,072	2,433	0,00517
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	30,573	30,470	30,676	0,287	0,938	0,08230
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	10,350	10,276	10,425	0,207	2,002	0,04294
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,501	6,444	6,559	0,161	2,471	0,02581
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	4,281	4,242	4,319	0,108	2,512	0,01157
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	78,851	78,552	79,150	0,835	1,058	0,69657
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	18,432	18,249	18,615	0,512	2,776	0,26189

Tabelle 5.5.1.7.2: Acetanilid und  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 9,2 (b-LAC-101204)

Um zu prüfen, ob auch in diesem Untersuchungsabschnitt Schwankungen durch die Probeninjektion verursacht werden, bildet man die Quotienten aus den korr. AU-Werten. Diese sind prinzipiell unabhängig von der scheinbaren Mobilität der Analyten und dem Probenvolumen [3]. Dabei stellt man fest, daß sich die Schwankungen für die Vergleichssubstanzen untereinander auf 0,85% reduzieren und im Fall des entsprechenden Quotienten von  $\beta$ -Lactoglobulin und Neostigmin auf 1,14% abnehmen. Daher lassen sich die Ergebnisse so interpretieren, daß bei pH 9,2 die beobachteten Schwankungen hauptsächlich durch Probleme mit der Probeninjektion verursacht werden. Da bei den Migrationszeiten eine generelle Zunahme zu beobachten ist (vgl. Abb. 5.49), gleichzeitig die Peakflächen aber höchstens um 1% streuen, sind Temperaturschwankungen als Grund anzusehen und nicht etwa Adsorptionseffekte. Bei den abschließenden Kontrollversuchen schwanken die Werte von  $t_{\text{Mig}}$ ,  $\mu_{\text{EOF}}$ , AU und korr. AU um maximal 1%, so daß auch zeitlich verzögerte Änderungen im analytischen System ausgeschlossen werden können.

## 5.5.2 Diskussion der Teilergebnisse in unbeschichteten Kapillaren

### 5.5.2.1 Vergleich der Resultate von filtrierter und unfiltrierter Lösung

Die Untersuchungen von  $\beta$ -Lactoglobulin zeigen auch bei diesem Protein, daß bei pH-Werten in der Nähe des IP Schwierigkeiten auftreten, wenn bei der zonenelektrophoretischen Analytik unbeschichtete Kieselglaskapillaren verwendet werden. Die bei pH 5,0 durchgeführten Versuchsreihen unterscheiden sich bezüglich der Reproduzierbarkeit des Peakmusters grundlegend. Bei beiden Meßserien (b-LAC-160403 und b-LAC-080505) kann das Protein nicht detektiert werden, allerdings treten bei den Versu-

chen mit der nicht filtrierten Probenlösung so große Schwankungen der elektroosmotischen Mobilität auf (vgl. Abb. 5.51 und 5.52), daß der EOF-Marker lediglich in einem Teil der Läufe detektiert werden kann. Vergleicht man die korrigierten Flächen des jeweils eingesetzten internen Standards (Abb. 5.49 und 5.50), so ändern sich die Werte im Fall filtrierten Probe (pH 5,0, Abb. 5.49) um lediglich 1,18%. Im Gegensatz dazu streuen die Zahlen bei der nicht filtrierten Lösung in den Grenzen von 10% bis 240% des Mittelwertes. Man kann daher schlußfolgern, daß die Proteinadsorption durch den Filtrationsschritt nicht verhindert werden kann, deren Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit des internen Standards sich aber reduzieren lassen.

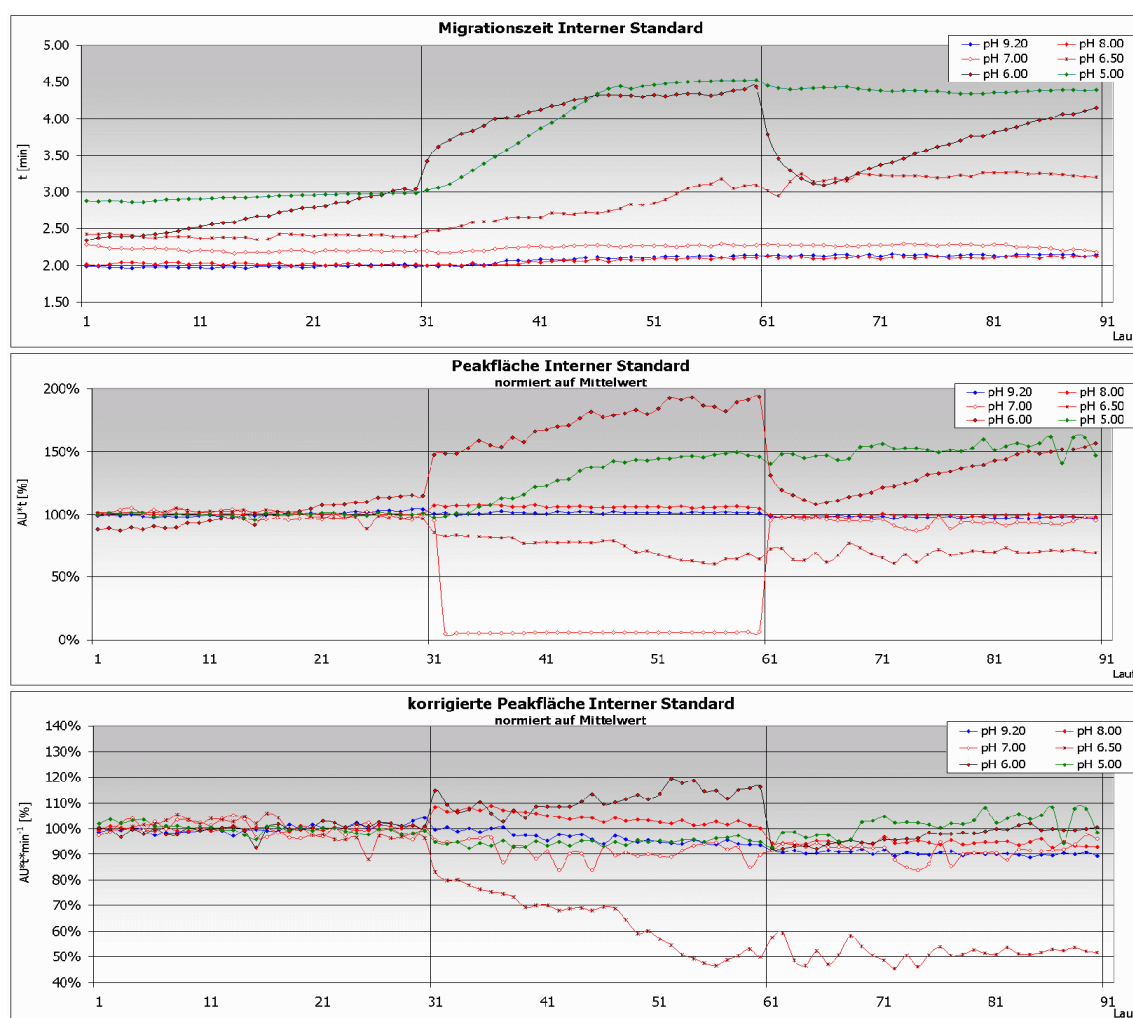


Abbildung 5.49: interner Standard Neostigmin; Ergebnisse pH 5,0-9,2, filtrierte Lösung

Bei den Versuchen bei pH 6,0 und 6,5 sind die Resultate schwer zu interpretieren. Im Fall der filtrierten Lösungen beobachtet man bei pH 6,0 eine Zunahme der scheinbaren und effektiven Mobilität im Verlauf der Untersuchungen. Gleichzeitig verändert sich die Peakform des  $\beta$ -Lactoglobulins grundlegend. Bei pH 6,5 hingegen nimmt die Mobilität des Analyten ab. Auch das Erscheinungsbild des Peaks stellt mit seiner fla-

chen, langgestreckten Form einen Gegensatz zu dem schmalen Signal bei pH 6,0 dar, zumal der EOF im Vergleich zu pH 6,5 weniger stark abnimmt.

Bei den entsprechenden Untersuchungen der nicht filtrierten Lösung (Abb. 5.49) beobachtet man die Zunahme der scheinbaren und effektiven Mobilitäten von  $\beta$ -Lactoglobulin bei pH 6,5, die ebenfalls mit einer Veränderung der Peakform einhergehen. Bei pH 6,0 tritt das Phänomen auf, daß sich nicht nur die Peaksymmetrie mehrfach ändert. Im Gegensatz zu der filtrierten Lösung stimmt die Migrationsreihenfolge hier mit dem prognostizierten Migrationsverhalten überein. Es ist möglich, daß die in voneinander unabhängigen Meßreihen beobachteten Veränderungen der Peakform auf Instabilitäten des Proteins in diesem pH-Bereich zurückzuführen sind.

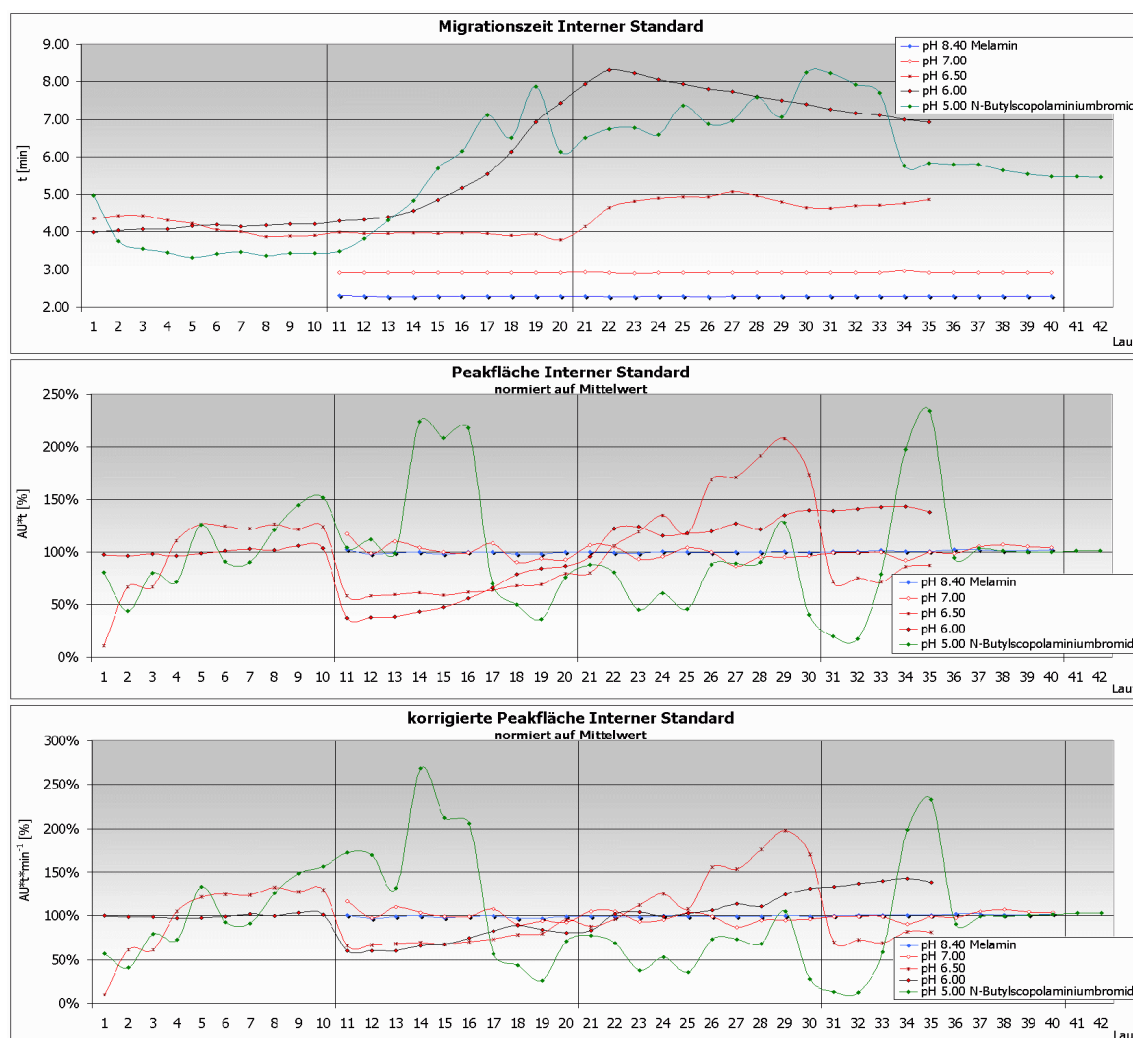


Abbildung 5.50: interne Standards; Ergebnisse pH 5,0-8,4, Probe nicht filtriert

Die verwendete bovine Form zeichnet sich im Vergleich zum  $\beta$ -Lactoglobulin, das aus Schweinen isoliert wird, dadurch aus, daß die Resistenz der Tertiär- und Quartärstruktur gegenüber sauren und thermischen Bedingungen größer ist. Im Gegensatz

dazu nimmt die Stabilität in neutralem bis schwach alkalischem Milieu deutlich ab [132][134]. Man kann annehmen, daß die zugrunde liegenden Veränderungen der Proteinfaltung bereits in schwach saurer Lösung einsetzen und durch Streßfaktoren wie Sterilfiltration und elektrische Felder verstärkt werden. Dies würde zur Erklärung der Unterschiede zwischen filtrierter und unfiltrierter Probe beitragen.

Die Versuchsreihen bei pH 7,0 unterscheiden sich demgegenüber durch eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit der Meßwerte. Insbesondere bei der elektroosmotischen Mobilität beobachtet man während der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin keine nennenswerten Schwankungen. Das gilt auch für die anderen Meßwerte, wobei die Schwankungen der Flächen und korrigierten Flächen auf Schwierigkeiten mit dem Injektionssystem bei der Meßserie b-LAC-150205 zurückgeführt werden können. Diese lassen sich durch die Verwendung der relativen Flächenwerte eliminieren.

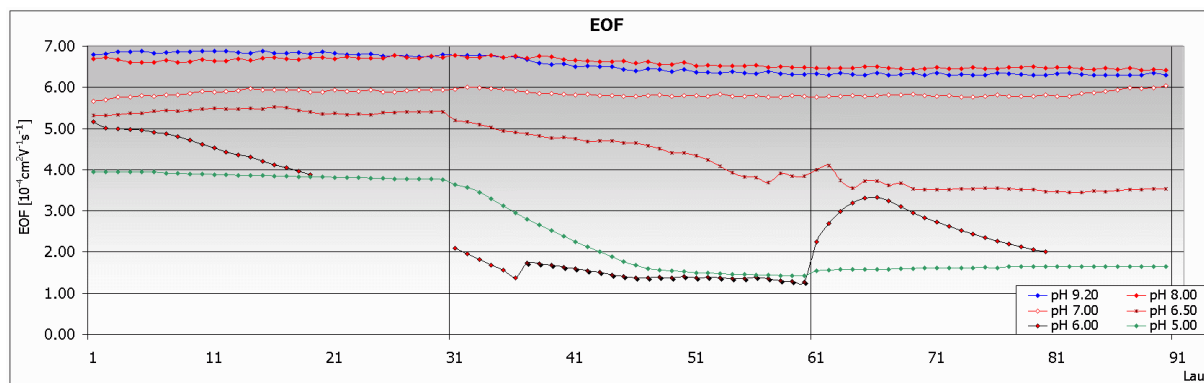


Abbildung 5.51:  $\beta$ -Lactoglobulin; Ergebnisse EOF-Marker pH 5,0-9,2

In Abb. 5.51 erkennt man bei den Meßreihen bei pH 8,0 und 9,2, daß die elektroosmotischen Mobilität während der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin abnimmt. Dies ist meistens ein Indiz für Adsorptionsprozesse. Korreliert man die Ergebnisse mit den abnehmenden Werten der korrigierten Flächen aller Analyte (s. Abb. 5.49 und 5.54), kommt man zu einem anderen Ergebnis. Die beobachtete Abnahme wird durch Temperaturschwankungen ausgelöst. Die gemessenen Schwankungen können durch die Bildung der Flächenquotienten eliminiert werden, was gegen Adsorptionsprozesse spricht. Bei pH 8,4 läßt sich kein vergleichbarer Abfall des EOF (vgl. 5.52) bzw. der Peakflächen erkennen. Vielmehr beobachtet man in den ersten beiden Läufen eine Zunahme der korr. Flächen, die nicht auf Injektionsfehler oder ähnliches zurückgeführt werden können. Insgesamt fällt auf, daß die Reproduzierbarkeit der Meßwerte

bei pH 7,0 und darüber deutlich verbessert ist und im Vergleich zu äußeren Faktoren, wie z.B. der Sterilfiltration, keinen deutlichen Einfluß auf die Wiederholpräzision hat.

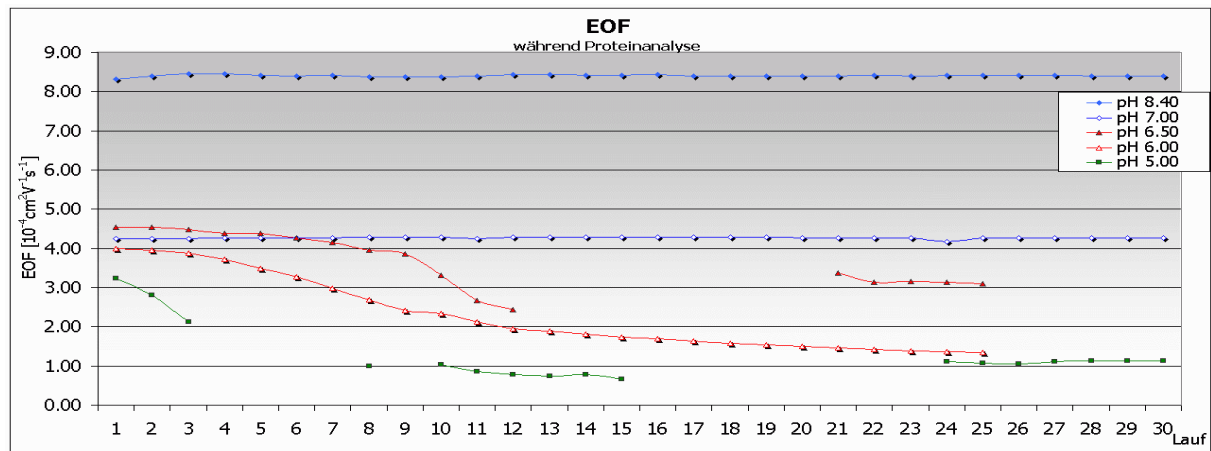


Abbildung 5.52: Ergebnisse EOF, unfiltrierte Lösungen pH 5,0-8,4

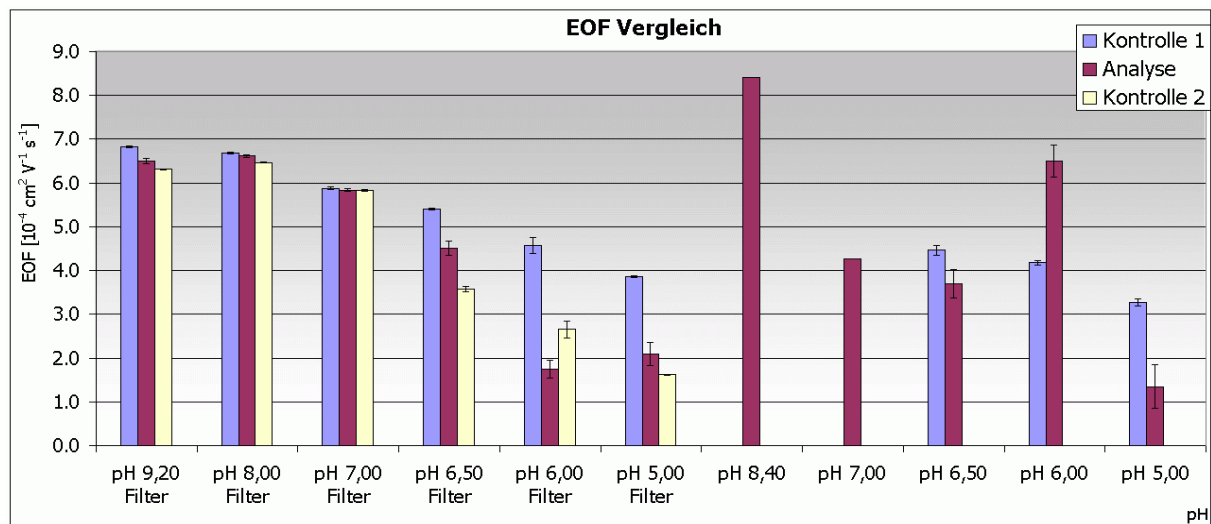


Abbildung 5.53: Balken-Diagramme EOF, pH 5,0-9,2

In Abb. 5.53 sind die Ergebnisse der elektroosmotischen Mobilitätsbestimmungen graphisch aufbereitet. Anhand dieser Darstellung läßt sich sehr leicht feststellen, daß  $\beta$ -Lactoglobulin erst bei  $\text{pH} > 7,0$  verläßlich bestimmt werden kann. Unterhalb dieses Grenzwertes bringt der zusätzliche Filtrationsschritt bei der Probenvorbereitung Vorteile, die sich aber auf die Bestimmung der Vergleichssubstanzen beschränken. Allerdings ist noch nicht geklärt, warum sich die Form des  $\beta$ -Lactoglobulin-Peaks bei pH 6,0-6,5 abrupt ändert und ob die Filtration darauf Einfluß hat.

Bei den Meßreihen oberhalb von pH 6,5 verändert sich die elektroosmotische Mobilität innerhalb einer Meßreihe nur geringfügig. Die scheinbare Abnahme des EOF in den Versuchsreihen bei pH 8,0 und 9,2 ist darauf zurückzuführen, daß die Temperaturabnahme während der Proteinuntersuchung erfolgt und diese entsprechend beein-

flußt. Diese Beispiele zeigen, daß Schwankungen des EOF bereits auf Adsorptionsprozesse hinweisen können (vgl. Kap. 5.3.1), sich entsprechende Annahmen aber erst durch den Vergleich mit den Resultaten der korrigierten Flächen stützen lassen.

In den Abb. 5.54 und 5.55 sind die Meßwerte für  $\beta$ -Lactoglobulin graphisch dargestellt. Um die Flächen trotz der teilweise deutlichen Unterschiede vergleichen und die photometrischen Einflüsse der verwendeten Puffersysteme eliminieren zu können, werden nicht die absoluten Werte aufgetragen. Vielmehr normiert man die einzelnen Meßwerte auf das arithmetische Mittel und stellt sie als Prozentangaben dar.

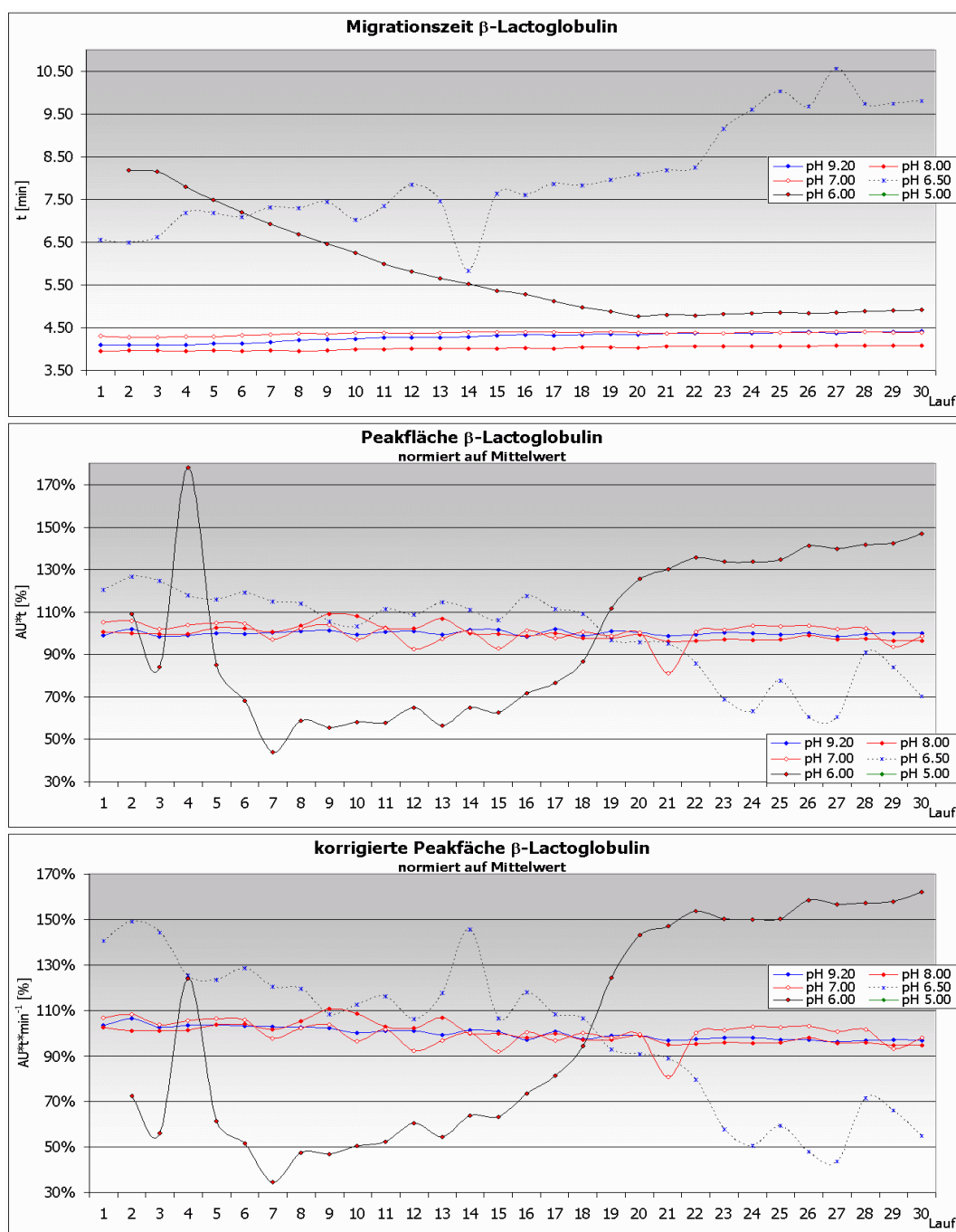


Abbildung 5.54: filtrierte Lösungen  $\beta$ -Lactoglobulin; Ergebnisse pH 5,0-9,2



Sowohl bei den filtrierten Lösungen (Abb. 5.54) als auch bei den unbehandelten Probelösungen (Abb. 5.55) streuen die Werte bei pH 6,0 und 6,5 deutlich um den Mittelwert. Bei pH 5,0 läßt sich der makromolekulare Analyt gar nicht erfassen. Aus diesem Grund fehlt eine entsprechende Meßfunktion.

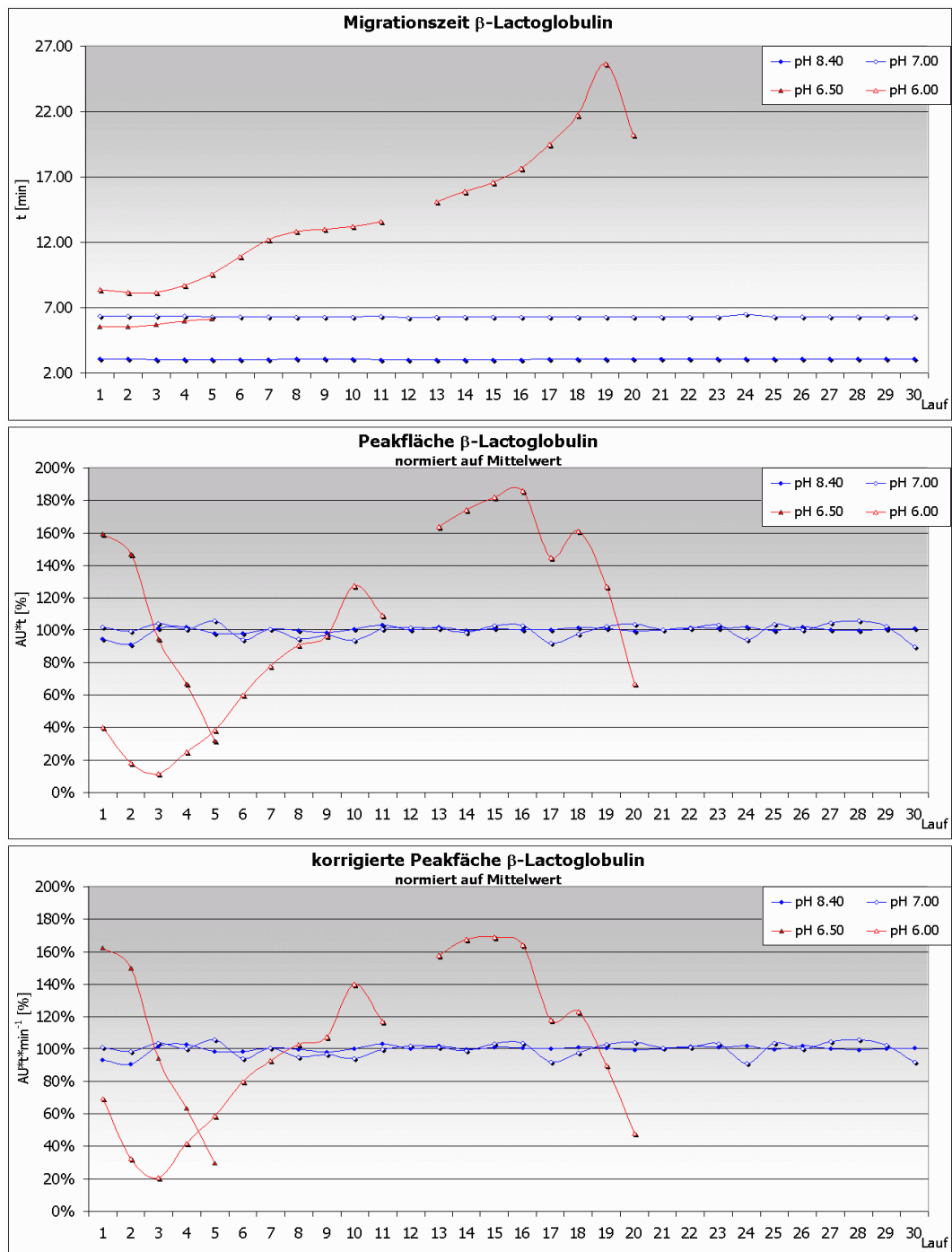


Abbildung 5.55: unfiltrierte Lösungen  $\beta$ -Lactoglobulin; Ergebnisse pH 5,0-8,4

### 5.5.2.2 Stabilität der Proteinstruktur

Bei den Untersuchungen in schwach saurer Lösung ist in den Elektropherogrammen eine Veränderung der Peakform mehrfach beobachtet worden. Bisher liegt noch kei-

ne eindeutige Erklärung dafür vor, warum sich das Migrationsverhalten der Proteinfraktion innerhalb weniger Läufe grundsätzlich ändert.

In neutralem und schwach alkalischem Milieu beobachtet man hingegen mehrere Fraktionen, die unter den Versuchsbedingungen nur teilweise getrennt werden, aber als solche zu erkennen sind. Diese Beobachtung ist deshalb hervorzuheben, weil es sich bei dem untersuchten  $\beta$ -Lactoglobulin um ein Gemisch der Varianten A und B handelt, die sich lediglich in zwei der 162 Aminosäuren unterscheiden. Während der unpolare Rest 118 (Var. A: Ala; Var. B: Val) kaum Einfluß auf die elektrophoretischen Eigenschaften hat, sind die Unterschiede an Position 64 größer. Die Variante B trägt dort einen unpolaren Glycin-Rest. Im Gegensatz trägt Variante A an dieser Stelle einen Glutamat-Rest, so daß sie bei  $\text{pH} > 5$  eine zusätzliche negative Ladung besitzt. Diese reicht aber nicht aus, um beide Varianten unter normalen CZE-Bedingungen voneinander trennen zu können. Allerdings wird dieser Substituent in der Literatur [6][134] als Grund für das unterschiedliche Denaturierungsverhalten und die abweichende Tertiärstruktur in Lösung angegeben.

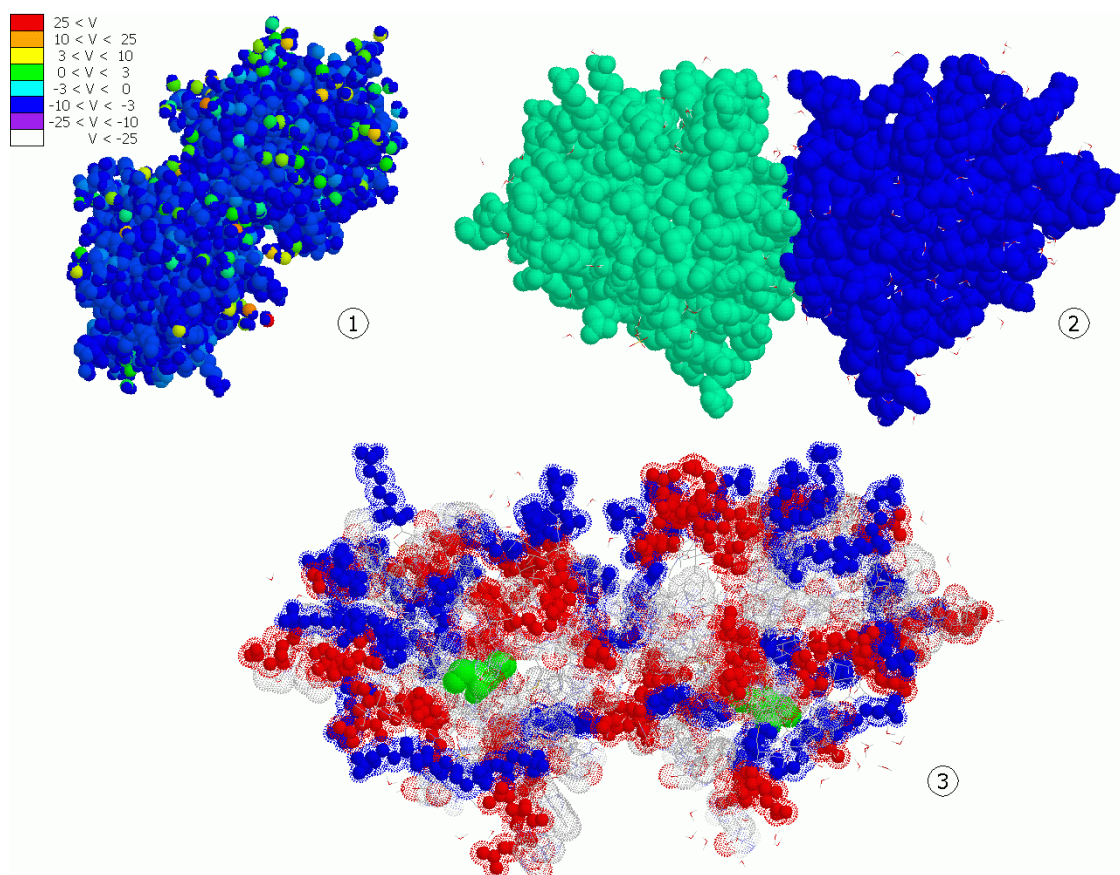


Abbildung 5.56:  $\beta$ -Lactoglobulin A, röntgenkristallographische Struktur (1BEB.pdb)

Die  $\beta$ -Lactoglobulin-Familie weist die strukturelle Besonderheit auf, daß sich ein Glutamat-Rest im unzugänglichen Kernbereich des Proteins befindet. Im Fall des bovinen Proteins handelt sich um Glu<sup>89</sup> (in Abb. 5.56 (3) grün markiert), das mit Ser<sup>116</sup> eine Wasserstoff-Brückenbindung bildet, die für Lösungsmittelmoleküle unzugänglich ist. Der pKS-Wert des Glutaminsäure-Restes liegt bei  $\sim 7,3$ . Dieses abnormale Verhalten beruht darauf, daß die Carboxyl-Funktion erst durch drastische Veränderungen der Tertiärstruktur bei pH 7,5-8 für Lösungsmittelmoleküle zugänglich wird.

Eine weitere Besonderheit des bovinen  $\beta$ -Lactoglobulins besteht darin, daß unterhalb von pH 3 und oberhalb von pH 8 das Dimer in die einzelnen Moleküle dissoziiert (vgl. Abb. 5.56, (2)). Da sich durch diesen Prozeß auch die effektive Mobilität ändert, kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch diesen Schritt die beobachteten Fraktionen bei pH 8,0-9,2 entstehen.

Bei thermodynamischen Untersuchungen des Proteins ist eine Eigenart festgestellt worden. Die Denaturierungsenergie (denaturation enthalpy) ist bei  $\beta$ -Lactoglobulin stark vom pH-Wert abhängig. Während dieser Wert ca.  $300 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bei pH 6,75-7,00 beträgt, sinkt er im schwach Alkalischen deutlich und erreicht  $0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bei pH 9,0. Das bedeutet, daß sich  $\beta$ -Lactoglobulin bei Raumtemperatur spontan entfalten kann. Die vorher verborgene, freie Cystein-Seitenkette ist dann frei zugänglich und kann zur Bildung von kovalent verknüpften Dimeren führen. Daneben bilden sich andere denaturierte Formen, welche an Oberflächen adsorbieren. Die alkalische Denaturierung des Proteins ist irreversibel. Insgesamt müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die zur Ausbildung der Proteinfractionen führen:

- unterschiedliche thermodynamische Stabilität der Varianten;
- Dissoziation des Dimers (pH>8);
- Tanford-Übergang und Ladungsveränderung (pH 7,5-8);
- spontane Denaturierung und Aggregation (pH>9).

Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß das Auftreten von zwei oder mehreren  $\beta$ -Lactoglobulin-Fractionen im pH-Bereich von 7,0-9,2 nicht auf einen einzelnen Prozeß zurückgeführt werden kann. Es ist daher wahrscheinlich, daß die beobachteten Signalaufspaltungen eine Folge parallel ablaufender Entfaltungsvorgänge sind.

Bei pH 9,2 lassen sich keine Anhaltspunkte für eine nachweisliche Proteinadsorption finden. Aufgrund der Peakform kann angenommen werden, daß ein Großteil der Pro-

teinmenge bereits die native Quartär- und Tertiärstruktur verloren hat. Um so wunderlicher ist es, daß keine signifikante Veränderung der elektroosmotischen Mobilität gemessen wird. Die Aminosäuresequenz von  $\beta$ -Lactoglobulin (2D-Swiss-Prot; <http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P02754>) weist 15 Lysin- ( $pK_{S3}=10,3$ ) und 3 Argininreste ( $pK_{S3}=13,2$ ) auf, die auch bei pH-Wert 9,2 als kationische Gruppen vorliegen. Infolge der Denaturierung und der damit verbundenen zufälligen Anordnung ist es unwahrscheinlich, daß die Ammoniumfunktionen durch intramolekulare Ionenbindungen mit den Glutamat- und Aspartatresten maskiert werden. Anscheinend ist die Summe der Anziehungskräfte nicht groß genug, um die Abstoßung zwischen Carboxyl-Funktionen und den Silanolaten der Kieselglasoberfläche zu kompensieren.

## 5.6 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren

### 5.6.1 Untersuchung des EOF in beschichteten Kapillaren

#### 5.6.1.1 Allgemeine Aspekte

Wie bereits in Kapitel 4.3 erwähnt, konnte in den Arbeiten von Kohr und Engelhardt [19] gezeigt werden, daß die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses nicht allein auf Kieselglasoberflächen beschränkt ist, sondern auch bei kovalent beschichteten Kapillaren beobachtet werden kann.

Die Stärke der elektroosmotischen Mobilität reicht beispielsweise aus, um bei der kapillariselektrischen Fokussierung den Mobilisierungsschritt vorzunehmen (vgl. Kap. 4.2). Im Vergleich zu unbeschichteten Kapillaren beträgt der EOF in solchen, die mit (linearem) Polyacrylamid-beschichtet sind, nur etwa 10-25% des Wertes in Kieselglaskapillaren. Für CZE-Methoden, bei denen auch neutrale oder nur partiell geladene Analyten untersucht werden sollen, ist die vorliegende elektroosmotische Mobilität unzureichend. Aus Gl. 22 (Kap. 1.4.5) läßt sich ableiten, daß durch den geringen Beitrag von  $\mu_{\text{EOF}}$  zur scheinbaren Mobilität  $\mu_{\text{app}}$  sich die Analysenzeiten unverhältnismäßig verlängern und die Migrationsgeschwindigkeit faßt ausschließlich von  $\mu_{\text{eff}}$  des Analyten abhängt. Sollen im Speziellen Proteine in der Nähe ihres IP untersucht werden, bei dem die Nettoladung des Makromoleküls gegen Null geht, müssen zusätzliche Maßnahmen ergriffen werden, um vertretbare Analysenzeiten erreichen zu können. Im Fall der SDS Kapillargelelektrophorese wird durch den Einsatz von Natriumdodecylsulfat eine zum Molekulargewicht proportionale Ladung auf die Proteine übertragen. Wenn hingegen unter nicht denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden soll, kann beispielsweise parallel zur Spannung Druck angelegt werden.

Diese Maßnahme wirkt sich auf die Trennleistung aus. Durch den angelegten Druck kommt es durch Reibungs- und Scherkräfte an der Kapillarwand zur Beeinträchtigung des idealerweise stempelförmigen Bandenprofils (vgl. Kap. 1.1.5). Gleichzeitig sind entsprechende Voruntersuchungen notwendig, um den Druck zu optimieren. Dieser darf nicht zu hoch eingestellt werden, damit eine ausreichende Trennleistung innerhalb der effektiven Kapillarlänge erreicht wird. Parallel muß darauf geachtet werden, daß die Strömungsturbulenzen an der Kapillaroberfläche kontrollierbar bleiben. Außerdem muß die Fließgeschwindigkeit so groß sein, daß die Probenzonen nicht durch

Dispersionsvorgänge unnötig verbreitert werden. An dieser Stelle gibt es einige Parallelen zur Kapillarchromatographie und anderen Mikrotrenntechniken, so daß bei den Untersuchungen von keinem reinen zonenelektrophoretischen Verfahren gesprochen werden kann.

Die Methode wird durch den zusätzlich eingesetzten Druck stärker von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur nimmt die Leitfähigkeit der Elektrolytlösung zu. Dadurch sinkt die Viskosität der wäßrigen Phase. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten wird somit nicht nur von der Spannungsregelung und der Effizienz des Kühlsystems bestimmt, sondern hängt zusätzlich von den Regel- und Steuersystemen des Drucksystems im CE-Gerät ab.

Bei dem zur Beschichtung der Oberfläche verwendeten Polyacrylamid handelt es sich um ein häufig eingesetztes Material. In Kapitel 3.3.3 wurde bereits auf die verschiedenen Herstellungsverfahren eingegangen. Für die Qualität der Kapillaren, und damit der Methode, ist entscheidend, daß die Beschichtung gleichmäßig und lückenlos auf dem Trägermaterial Kieselglas verankert wird. Weist das Polyacrylamid variable Schichtdicken auf, kann dies dazu führen, daß kein axial gleichförmiges Strömungsprofil vorliegt und dadurch die Probenbanden zusätzlich deformiert werden. Darüber hinaus besteht die Gefahr, daß in den Bereichen, in denen die Beschichtung zu dünn ist, Analyte adsorbieren, weil das Oberflächenpotential an der Kieselglasoberfläche unzureichend abgeschirmt wird (vgl. Kap. 4.3). Außerdem setzt die pH-abhängige Korrosion der Polymerschicht in diesem Bereich zuerst ein, da die Anker-Gruppen besser zugänglich sind und hydrolytisch gespalten werden können.

Zu den Zielen der Proteinuntersuchungen gehört u.a. auch zu überprüfen, ob die Verwendung von beschichteten Kapillaren dazu beiträgt, die Robustheit und Präzision einer CZE-Methode zu verbessern. Zweckmäßigerweise werden für die Versuche Bedingungen gewählt, bei denen die Analytik in unbeschichteten Kapillaren wegen starker Proteinadsorption keine brauchbaren Ergebnisse liefert (vgl. Kap. 2).

### **5.6.1.2 Präzision in Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren**

Das in Kapitel 5.2.1 beschriebene Modell soll auch auf die Versuchsreihen mit Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren angewendet werden. Um im Vorfeld der Untersuchungen zu klären, wie die Parameter Spannung und Druck optimiert werden müssen, führt man Vorversuche durch. Bei diesen wird ein Substanzgemisch aus Neostig-

min, Acetanilid und Nicotinsäure verwendet, das bei pH 7,0 in einem 25 mM Phosphat-Puffer untersucht wird. Spannung und Druck lassen sich innerhalb gewisser Grenzen variieren, um eine bestimmte Migrationsgeschwindigkeit zu erreichen.

Die elektroosmotische Mobilität ist eine der wichtigen Meßgrößen, die sich in unbeschichteten Kapillaren relativ leicht experimentell bestimmen läßt (vgl. Gl. 21). Diese Vorgehensweise ist bei beschichteten Kapillaren hingegen nicht direkt möglich, wenn man die deutlich längeren Analysenzeiten vermeiden möchte.

Geht man davon aus, daß bei einem Druck von weniger als 100 mbar laminare Strömungsverhältnisse in der Kapillare herrschen, gilt das Hagen-Poiseuillesche Gesetz, so daß sich die Strömungsgeschwindigkeit nach Gl. 4 berechnen läßt. Dabei setzt man voraus, daß die Viskosität des Puffers und die von Wasser übereinstimmen und daß isotherme Bedingungen vorliegen. Unter der Annahme, daß sich die Fließgeschwindigkeit durch Vektoraddition der elektroosmotischen bzw. hydrodynamisch verursachten Strömungsgeschwindigkeiten berechnen läßt, kann man aus den Gl. 4, 19 und 20 (s. Kap. 1.4) die nachstehende Gleichung 27 ableiten. Mit deren Hilfe läßt sich näherungsweise die elektroosmotische Mobilität abschätzen.

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{1}{E} \cdot (v_{\text{ges}} - v_{\text{hyd}}) = \frac{1}{E} \cdot \left( \frac{l_{\text{det}}}{t_{\text{EOF}}} - \frac{\Delta p \cdot r^2}{8\eta \cdot l_{\text{ges}}} \right) \quad (\text{Gl. 27}).$$

- $\mu_{\text{EOF}}$ : elektroosmotische Mobilität [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $v_{\text{hydr}}$ : Strömungsgeschwindigkeit [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $E$ : Feldstärke [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]  
 $v_{\text{ges}}$ : Migrationsgeschwindigkeit gesamt [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $v_{\text{EOF}}$ : Migrationsgeschwindigkeit EOF-Marker [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $v_{\text{hyd}}$ : Fließgeschwindigkeit infolge Druck [ $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  
 $l_{\text{ges}}$ : Kapillarlänge [m]  
 $t_{\text{EOF}}$ : Migrationszeit EOF-Marker [s]  
 $\Delta p$ : hydrodynamischer Druck [mbar]  
 $r$ : Innenradius der Kapillare [m]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]

Die Untersuchungen zeigen, daß es von Vorteil ist, mit einer hohen Spannung zu arbeiten und lediglich einen geringen zusätzlichen Druck anzulegen (vgl. Kap. 9.11). In Abb. 5.57 sind die Ergebnisse der korr. AU-Werte und des nach Gl. 27 berechneten  $\mu_{\text{EOF}}$  angegeben. Die Resultate zeigen, daß der EOF etwa nur 1/10-tel der sonst in unbeschichteten Kapillaren beobachteten Stärke aufweist. Gleichzeitig deutet die graphische Darstellung darauf hin, daß sich die Reproduzierbarkeit der Peakflächen bei niedriger Spannung verschlechtert. Erhöht man gleichzeitig den Druck, treten größe-

rer Schwankungen auf, so daß man annehmen kann, daß die druckabhängige Strömungskomponente die Hauptursache für die Streuung der Meßwerte darstellt.

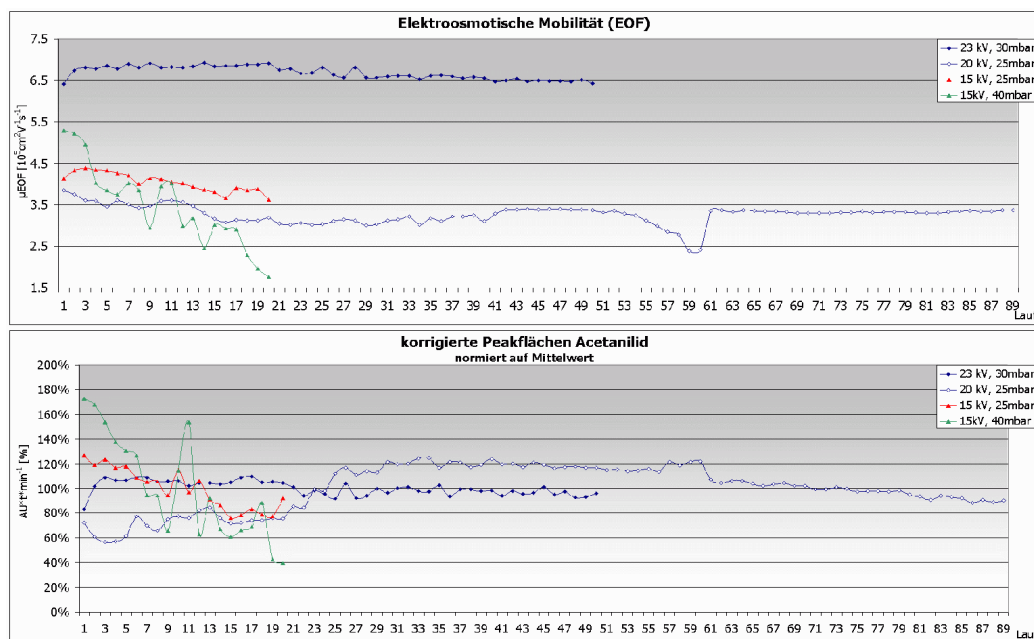


Abbildung 5.57: LPA Testergebnisse, pH 7,0

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
			23 kV, 25 mbar n=50					
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	3,058	2,967	3,165	0,060	1,975	0,00365
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	86,035	71,427	94,521	4,933	5,734	24,33861
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	28,167	22,568	31,594	2,045	7,260	4,18154
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	6,682	6,413	6,920	0,155	2,319	0,02401
			20 kV, 25 mbar n=89					
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	5,676	4,973	7,153	0,327	5,755	0,10668
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	190,552	99,281	290,853	41,557	21,809	1727,00448
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	33,412	18,941	41,692	6,263	18,743	39,22021
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,267	2,380	3,851	0,225	6,890	0,05066
			15 kV, 25 mbar n=20					
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	4,797	4,482	5,218	0,219	4,557	0,04780
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	42,646	34,250	53,370	5,659	13,271	32,02901
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,943	6,811	11,335	1,492	16,680	2,22533
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,038	3,625	4,380	0,226	5,608	0,05128
			15 kV, 40 mbar n=20					
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	4,963	3,502	7,213	1,026	20,665	1,05204
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	18,140	11,311	26,091	4,780	26,351	22,84827
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	3,938	1,568	6,794	1,651	41,919	2,72445
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,468	1,768	5,294	1,003	28,913	1,00534

Tabelle 5.6.1.2.1: System-Test in LPA beschichteten Kapillaren, EOF berechnet s. 5.6.1.1

Die Ergebnisse für Acetanilid in den verschiedenen Meßreihen sind in Tab. 5.6.1.2.1 zusammengefaßt. Die ermittelten Streuungen sind vergleichsweise größer als die bei Neostigmin beobachteten, aber kleiner als die Abweichungen, die bei Nicotinsäure auftreten. Da die graphischen Auswertungen der beiden anderen Substanzen ähnli-



che Verläufe zeigen, wird für die Auswertung auch der jeweilige Quotient aus den Flächen- bzw. korrigierten Flächenwerten gebildet.

Die Werte in Tab. 5.6.1.2.2 belegen, daß sich der Einfluß des Injektionssystems als einer der Fehlerquelle eliminieren läßt, wenn die absoluten Flächenwerte zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Die hier gemessenen Schwankungen sind signifikant größer als die RSD%AU-Werte in unbeschichteten Kapillaren. Die Graphen in Abb. 5.57 (25 mbar und 23 bzw. 20 kV) zeigen aber auch, daß die Werte nicht über den gesamten Bereich gleichmäßig streuen. So können in Teilbereichen mit 20 Läufen RSD%-Werte von ca. 3,5% und weniger erreicht werden.

<b>RSD% relative Flächen</b>		<b>Neostigmin - Acetanilid</b>	<b>Neostigmin - Nicotinsäure</b>	<b>Acetanilid - Nicotinsäure</b>
Flächen	[AU*t]			
23 kV	25 mbar; n=50	3,118	5,073	5,969
20 kV	25 mbar; n=89	5,687	-	-
15 kV	25 mbar; n=20	5,377	9,751	11,828
15 kV	40 mbar; n=20	17,830	89,639	33,757
korrigierte Flächen	[AU*t*min <sup>-1</sup> ]			
23 kV	25 mbar; n=50	3,298	3,769	5,266
20 kV	25 mbar; n=89	3,706	-	-
15 kV	25 mbar; n=20	5,192	12,986	14,037
15 kV	40 mbar; n=20	19,033	29,421	36,051

Tabelle 5.6.1.2.2: prozentuale RSD% der Peakflächenquotienten

Eine mögliche Fehlerquelle, die berücksichtigt werden muß, ist die Qualität des Detektionsfensters. Während sich diese bei unbeschichteten Kapillaren durch eine optische Prüfung leicht feststellen läßt, ist das bei beschichteten Kapillaren nicht möglich. Um die äußere Polyimid-Beschichtung zu entfernen, wird die entsprechende Stelle mit heißer, konzentrierter Schwefelsäure behandelt. Im Vergleich zum üblichen Einbrennen des Fensters ist die thermische Belastung der Polymerschicht auf der Innenseite kleiner. Es kann aber nicht davon ausgegangen werden, daß das Polyacrylamid unbeschädigt bleibt. Kommt es in diesem Bereich zur teilweisen Zerstörung des Polymers, liegt ein Teil der Kieselglasoberfläche frei. Das führt dazu, daß die Taylor-Aris-Dispersion auftritt (Kap. 5.1.3.3), und der Strahlengang durch die ungleichmäßige Oberflächenbeschaffenheit zusätzlich beeinträchtigt wird.

### 5.6.2 Tagespräzision - Einmaliger Gebrauch

Die Untersuchungen von  $\beta$ -Lactoglobulin in Kieselglaskapillaren zeigen, daß man bei der Analytik mittels CZE mit erheblichen Problemen bei der Robustheit und Präzision zu rechnen hat. Diese Komplikationen stehen in Zusammenhang mit der Proteinadsorption, die zu stark veränderten Oberflächeneigenschaften der Kapillare führt. Die Schwierigkeiten treten nicht nur direkt um den IP (theo. 4,81) von  $\beta$ -Lactoglobulin auf, sondern sind auch bei pH 6,5 noch zu beobachten. Daher soll geklärt werden, ob das Protein einen abweichenden IP aufweist, oder ob andere Gründe für das ungewöhnliche Verhalten existieren. Im Rahmen von Faltungsstudien an  $\beta$ -Lactoglobulin B wurde der IP von Skelsey und Bushey mittels CIEF-Untersuchungen bestimmt. Der ermittelte Wert liegt bei 5,28 [133] und macht daher proteinimmanente Faktoren als Ursache wahrscheinlich. Die bei pH 6,5 beobachteten Protein-Peaks weisen auf deutliche Wechselwirkungen mit der nativen Kapillaroberfläche hin. Da bei diesem pH-Wert sowohl das Protein als auch die Oberfläche negativ geladen sind, lassen sich die Wechselwirkungen nur mit dem Vorliegen von kationischen Domänen begründen.

Es bietet sich daher an, die Untersuchungen an dem dimeren Globulin in Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren fortzusetzen. Wenn die Probleme direkt durch ionische Wechselwirkungen zwischen Kieselglas und Analyt ausgelöst werden, sollte die Verwendung der Polyacrylamid-modifizierten Kapillaren deutliche Verbesserungen bringen. Allerdings muß man berücksichtigen, daß wenig polare Oberflächen selbst zu Schwierigkeiten in der Analytik führen können. Die in der Proteinchemie etablierte hydrophobe Wechselwirkungschromatographie (hydrophobic interaction chromatography, HIC) [135] beruht auf der Trennung von Analyten aufgrund von unterschiedlich ausgeprägten Affinitäten zu unpolaren Oberflächen. Deshalb kann auch im Fall von beschichteten Oberflächen eine Adsorption nicht ausgeschlossen werden.

Prinzipiell existieren zwei Gründe, warum es bei der Verwendung beschichteten Kapillaren möglicherweise zur Proteinadsorption kommt. Entweder treten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Beschichtung und unpolaren Bereichen des Proteins auf und induzieren dadurch die Denaturierung [108]. Die zweite Ursache, die im Fall von  $\beta$ -Lactoglobulin in Betracht gezogen werden muß, besteht in den Konformationsänderungen des Proteins im Bereich zwischen pH 5 und 7. Diese verändern die physikochemischen und somit auch die elektrophoretischen Eigenschaften. Werden im

konformativen Übergangszustand Teile des hydrophoben Kerns der Proteinstruktur zugänglich, kann das Adsorptionsprobleme verursachen. Deshalb wird das elektrophoretische Verhalten von  $\beta$ -Lactoglobulin in mehreren Versuchsreihen im Bereich zwischen pH 5,5 und 7,0 untersucht. Anhand der Ergebnisse läßt sich möglicherweise ein Teil der offenen Fragen klären, die in den bisherigen Versuchen aufgetreten sind.

### 5.6.2.1 Untersuchungen bei pH 5,3 bzw. 5,5

Bei den Untersuchungen um pH 5,5 wird ein 50 mM Acetat-Puffer verwendet. Aufgrund der in der Literatur [133] angegebenen Werte besteht potentiell die Gefahr, daß  $\beta$ -Lactoglobulin mit dem EOF-Marker komigriert oder sich zumindest die Peaks überlagern. Aus diesem Grund wird in einer zweiten Meßreihe auf Acetanilid zugunsten von Nicotinsäure verzichtet. Zu Beginn der jeweiligen Versuchsreihe werden die systemimmanenten Streuungen bestimmt. Bei den Werten für die Flächen bzw. korrigierten Flächen fällt auf (Tab. 5.6.2.1.1), daß die Schwankungen gegenüber den in Kap. 5.6.1.2 durchgeführten Versuchen geringer ausfallen, wobei mit einer Spannung von 20 kV und 40 mbar Druck gearbeitet wird.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-140104								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,520	4,512	4,527	0,020	0,447	0,00041
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	150,172	148,632	151,712	4,303	2,866	18,51741
korrr. Fläche	[AU]	Acetanilid	33,227	32,881	33,572	0,964	2,903	0,93014
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,751	3,742	3,759	0,024	0,630	0,00056
PM-LAC-210104								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Nicotinsäure	5,314	5,292	5,337	0,062	1,175	0,00390
Fläche	[AU·min]	Nicotinsäure	279,827	276,658	282,997	8,856	3,165	78,43392
korrr. Fläche	[AU]	Nicotinsäure	52,665	52,002	53,328	1,852	3,517	3,43029

Tabelle 5.6.2.1.1: Systempräzision, pH 5,3 bzw. 5,5 (Serien PM-LAC-140104 u. PM-LAC-210104)

Nachfolgend sind jeweils einige Elektropherogramme aus beiden Meßreihen dargestellt. Auf den ersten Blick läßt sich bereits die deutliche verbesserte Reproduzierbarkeit des Peakmusters im Vergleich zu unbeschichteten Kapillaren erkennen.

In Abb. 5.58 sieht man, daß sich die Peaks von Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) überlappen. Die Zuordnung der Substanzen zu dem jeweiligen Signal erfolgt anhand der Elektropherogramme aus den Kontrollreihen, die vor bzw. nach der Proteinuntersuchung durchgeführt werden, durch Vergleich der Migrationszeiten. Bei der Auswertung ergibt sich deshalb das Problem, daß die Flächenwerte stark davon vom abhängen, wie sehr die Peaks überlappen. In Folge dessen streuen die Werte bei Acetanilid

und noch deutlicher bei  $\beta$ -Lactoglobulin als bei Neostigmin (1), während die Migrationszeiten aller drei Analyten gleiche RSD% von 2,31-2,47% aufweisen.

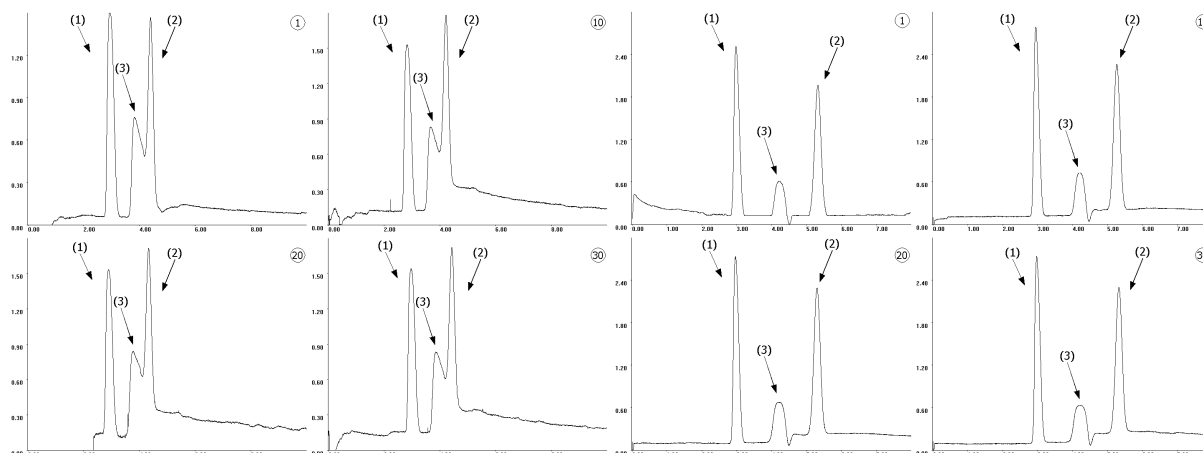


Abbildung 5.58:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; PM-LAC-140104)  
Phosphat-Puffer pH 5,3,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 67 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Abbildung 5.59:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; PM-LAC-210104)  
Phosphat-Puffer pH 5,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 68 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Nicotinsäure und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-140104							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Neostigmin	2,898	2,873	2,922	0,067	2,306	0,00447
Fläche [AU·min]	Neostigmin	267,554	265,238	269,870	6,364	2,378	40,49436
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	92,357	91,493	93,222	2,375	2,571	5,63977
PM-LAC-140104							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,332	4,293	4,371	0,106	2,453	0,01129
Fläche [AU·min]	Acetanilid	181,901	178,556	185,246	9,192	5,053	84,48582
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	42,004	41,224	42,784	2,143	5,102	4,59206
EOF [ $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,984	3,934	4,034	0,137	3,434	0,01872
PM-LAC-210104							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Nicotinsäure	5,289	5,282	5,296	0,021	0,388	0,00042
Fläche [AU·min]	Nicotinsäure	314,927	311,190	318,665	10,445	3,317	109,10020
korr. Fläche [AU]	Nicotinsäure	59,547	58,821	60,273	2,028	3,406	4,11284

Tabelle 5.6.2.1.2: Acetanilid bzw. Nicotinsäure, pH 5,3 bzw. 5,5

Bei der Meßreihe PM-LAC-210104 wird Nicotinsäure an Stelle von Acetanilid als Vergleichssubstanz verwendet. Dadurch soll eine Überschneidung von Peaks verhindert werden und gleichzeitig die Option erhalten werden, bei der Auswertung die Flächen auf eine zweite Substanz beziehen zu können. Die statistische Auswertung zeigt, daß die Migrationszeiten während der Untersuchung unverändert bleiben gegenüber den Versuchen zur Bestimmung der Systempräzision. Die Peakflächen der Nicotinsäure weisen mit 3,32% bzw. 3,41% etwas größere Schwankungen auf als die Werte bei Neostigmin (2,89% bzw. 2,99%). Bildet man den Quotienten der Flächen, reduziert sich die Streuung auf max. 1,66%. Die Werte entsprechenden Werte des Proteins

(Tab. 5.6.2.1.3) variieren mit knapp 7,5% RSD% erheblich mehr. Auch die Verwendung des Flächenquotienten bringt keine nennenswerte Verbesserung, da die RSD% selbst bei den korr. AU-Werten 5,8% nicht unterschreitet (vgl. Tab. 5.6.2.1.4).

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-140104							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	3,770	3,736	3,804	0,093	2,468	0,00866
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	102,782	97,794	107,769	13,703	13,332	187,76179
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	27,240	25,992	28,487	3,427	12,582	11,74624
PM-LAC-210104							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	4,208	4,202	4,214	0,017	0,393	0,00027
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	139,142	135,460	142,823	10,288	7,394	105,84094
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	33,071	32,189	33,953	2,466	7,456	6,08007

Tabelle 5.6.2.1.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 5,3 bzw. 5,5

RSD% relative Flächen		Neostigmin - Acetanilid	Neostigmin - $\beta$ -Lactoglobulin	Acetanilid - $\beta$ -Lactoglobulin
PM-LAC-140104				
AU	Kontrolle 1	2,346		
	Protein	5,950	20,815	20,812
	Kontrolle 2	1,982		
korr. AU	Kontrolle 1	2,365		
	Protein	6,057	20,918	20,977
	Kontrolle 2	1,926		
		Neostigmin - Nicotinsäure	Neostigmin - $\beta$ - Lactoglobulin	Nicotinsäure - $\beta$ -Lactoglobulin
PM-LAC-210104				
AU	Kontrolle 1	1,661		
	Protein	1,769	6,843	5,812
	Kontrolle 2		Kapillare gebrochen	
korr. AU	Kontrolle 1	1,472		
	Protein	1,722	7,049	6,028
	Kontrolle 2		Kapillare gebrochen	

Tabelle 5.6.2.1.4: prozentuale RSD% der Peakflächenquotienten

Während der Quotient der Flächen bei den Vergleichssubstanzen gleichmäßig um den Mittelwert schwankt, beobachtet man bei den Werten für  $AU_{\text{interner Standard}}/AU_{\text{Protein}}$  eine Abnahme. Da gleichzeitig die Peakflächen von  $\beta$ -Lactoglobulin im Verlauf der Messungen zunehmen, bestätigt das die Annahme, daß zu Beginn ein Teil des Proteins adsorbiert. Da der Einfluß von  $v_{\text{EOF}}$  an der Migrationsgeschwindigkeit klein ist, wirkt sich die Adsorption nicht meßbar auf die Meßgröße aus.

Da die Reproduzierbarkeit der Werte bei  $\beta$ -Lactoglobulin ab dem 12. Lauf etwa derjenigen der Vergleichssubstanzen entspricht, scheint sich ab diesem Zeitpunkt ein Gleichgewicht zwischen Adsorptions- und Desorptionsvorgängen eingestellt zu ha-

ben. Beim Vergleich der beiden Meßreihen fällt zunächst auf, daß sich sowohl das Peakmuster als auch die Migrationszeiten in jeder Meßreihe gut reproduzieren lassen. Die Tagespräzision von  $t_{\text{Mig}}$  beträgt 2,37% (n=80) bzw. 0,99% (n=60) RSD% im Fall von Neostigmin. Im Gegensatz dazu treten bei den Peakflächen größere Streuungen auf. Bildet man den Quotienten aus den Flächen der Vergleichssubstanzen, so lassen sich die Schwankungen eliminieren, die durch das Injektionssystem verursacht werden. Bei  $\beta$ -Lactoglobulin führt diese Vorgehensweise zu keinen Verbesserungen, da die Adsorption gegenüber unbeschichteten Kapillaren deutlich reduziert, aber nicht unterdrückt werden kann.

### 5.6.2.2 Untersuchungen bei pH 6,0

Die Versuche mit unbeschichteten Kapillaren zeigen, daß im Bereich von pH 6,0-6,5 abrupte Veränderungen des Peakmusters und insbesondere der Peakform von  $\beta$ -Lactoglobulin auftreten. Daher sollen die Untersuchungen in LPA-beschichteten Kapillaren darüber Aufschluß geben, ob diese Beobachtungen in Zusammenhang mit den ionischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Kieselglasoberfläche stehen. Zu Beginn der Versuchsreihen wird die Systempräzision bestimmt.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{\sigma}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-201103								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	2,202	2,193	2,211	0,026	1,200	0,00070
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	508,966	505,874	512,057	8,638	1,697	74,62005
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	231,166	229,505	232,827	4,642	2,008	21,54501
PM-LAC-051203								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	2,637	2,609	2,665	0,077	2,905	0,00587
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	305,669	299,970	311,368	15,659	5,123	245,18986
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	115,891	114,341	117,442	4,261	3,676	18,15365
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,292	4,220	4,364	0,198	4,618	0,03929
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	178,605	175,018	182,191	9,854	5,517	97,09371
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	41,630	41,195	42,065	1,196	2,873	1,43008
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,623	4,508	4,738	0,316	6,830	0,09969

Tabelle 5.6.2.2.1: Systempräzision, pH 6,0

Der verwendete Phosphat-Puffer hat eine Konzentration von 50 mM. Bei der Elektrophorese wird eine Spannung von 20 kV angelegt. Der zusätzliche Druck beträgt 30 mbar (PM-LAC-201103) respektive 40 mbar (PM-LAC-051203; vgl. auch Kap. 9.5.3 und 9.5.4). Bei der Meßreihe PM-LAC-201103 tritt das Problem auf, daß der EOF-Marker während der gesamten Meßreihe nicht detektiert wird. Um dennoch Aussagen zur Systempräzision treffen zu können, müssen die Ergebnisse von Neostigmin herangezogen und mit den Resultaten der Meßreihe PM-LAC-051203 verglichen wer-

den. Gegenüber der Reihe, bei der ein Druck von 30 mbar angelegt wird, variieren die Migrationszeiten bei  $p=40$  mbar merklich weniger, auch die Peakflächen lassen sich besser reproduzieren.

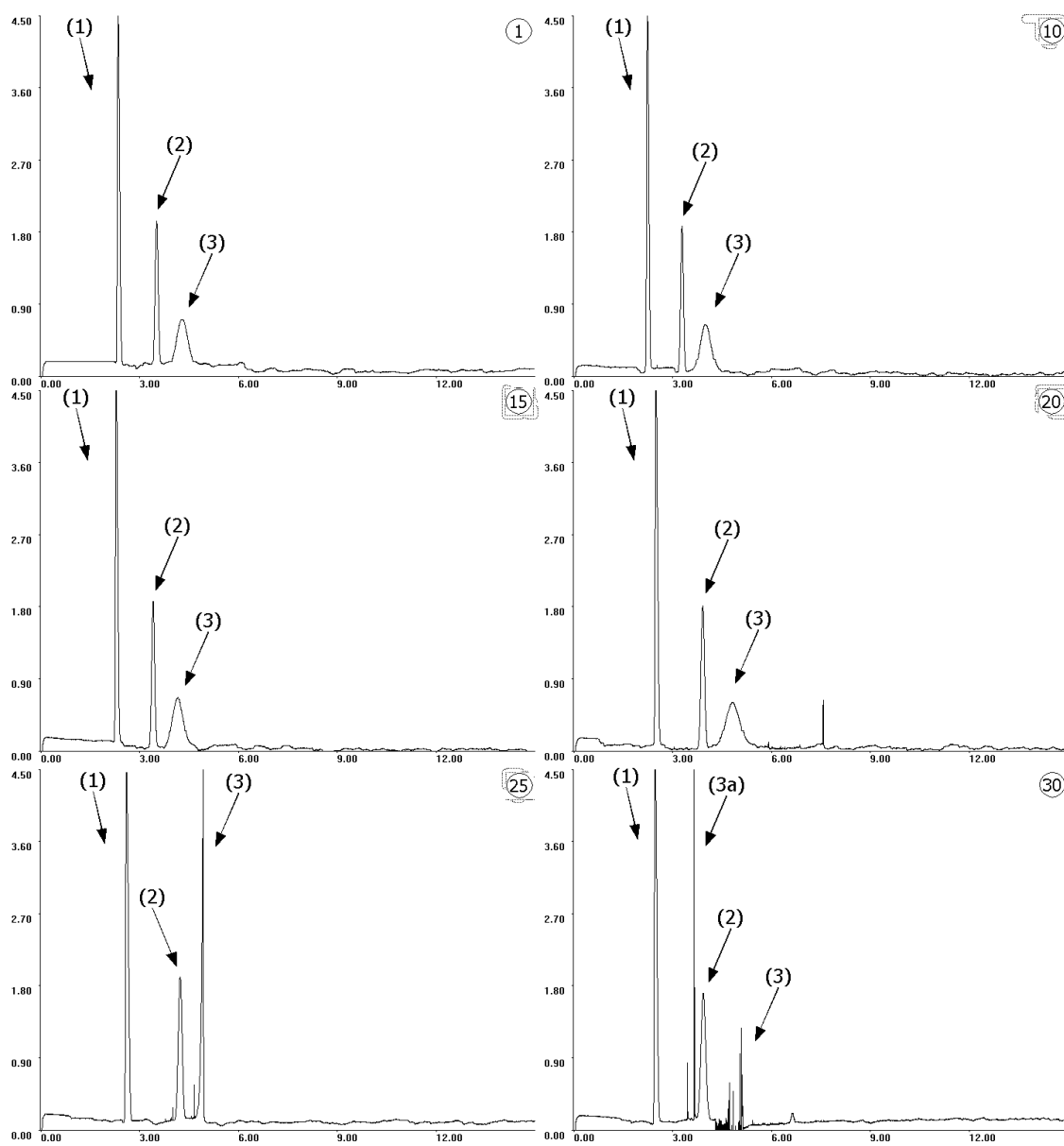


Abbildung 5.60:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; PM-LAC-051203)  
Phosphat-Puffer pH 6,1,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=30 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 81 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 20, 25, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

In Abb. 5.60 sind verschiedene Elektropherogramme aus der Meßreihe zusammengestellt, die zur Illustration der gemachten Beobachtungen beitragen. Deutlich ist zu erkennen, daß sich das Peakmuster in den ersten 20 Läufen reproduzieren läßt. Erst ab dem 24. Lauf treten Veränderungen auf, dafür sind diese um so drastischer. In Lauf 25 ist der  $\beta$ -Lactoglobulin-Peak (3) wesentlich schmaler und höher. Parallel dazu nimmt nur bei  $\beta$ -Lactoglobulin die Peakfläche um über 25% zu, wenn man die Läufe

23 und 25 miteinander vergleicht. In den folgenden Läufen bleibt die schmale Peakform erhalten, jedoch zeigt das Protein eine deutliche Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit gegenüber dem EOF-Marker (1). In den letzten beiden Elektropherogrammen ist sogar die Migrationsreihenfolge vertauscht. Auch bei Neostigmin (1) treten Schwankungen der Migrationszeiten auf, allerdings sind diese wegen der höheren effektiven Mobilität des Analyten weniger von den Prozessen betroffen.

Die in Tab. 5.6.2.2.2 für Acetanilid zusammengestellten Ergebnisse zeigen lediglich das Ergebnis der statistischen Auswertung. Berücksichtigt man hingegen nur die Läufe 1-20, bei denen das Peakmuster noch reproduzierbar ist, halbieren sich die RSD%-Werte nahezu für  $t_{\text{Mig}}$  und AU. Die Ergebnisse des internen Standards unterliegen vergleichbaren Schwankungen, auch wenn sie weniger ausgeprägt sind.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,615	3,483	3,747	0,344	9,514	0,11827
Fläche [AU·min]	Acetanilid	154,594	147,440	161,748	18,612	12,039	346,40948
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	42,687	42,123	43,251	1,467	3,437	2,15313
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,748	5,508	5,988	0,623	10,845	0,38862

Tabelle 5.6.2.2.2: Acetanilid pH 6,1 (Serien PM-LAC-051203)

Auch bei der Meßserie PM-LAC-201103 beobachtet man die gleichen Veränderungen des Proteinpeaks. Diese treten allerdings bereits nach dem sechsten Lauf auf und im achten Elektropherogramm erkennt man die gleiche Peakform wie bei Lauf 25 in Abb. 5.60. Man beobachtet ebenfalls das Phänomen, daß die Migrationszeit des Proteins abnimmt. Gleichzeitig nimmt die Differenz zu Neostigmin während der Meßreihe ab. Daraus muß geschlußfolgert werden, daß sich die physikochemischen Eigenschaften von  $\beta$ -Lactoglobulin bei pH 6,0 gravierend ändern.

Vergleicht man die Auswertung von beiden Meßserien für das Protein (Tab. 5.6.2.2.3), so stellt man fest, daß in Serie PM-LAC-211103 viel größeren Abweichungen auftreten. Diese lassen sich darauf zurückführen, daß die Veränderungen der Peakform und damit auch die Schwankungen viel früher eintreten. Eliminiert man die Einflüsse des Injektionssystems über die RSD% der Flächenquotienten, so lassen sich teilweise geringere Abweichungen erhalten. Diese sind aber unerheblich, da eine verlässliche Quantifizierung bei pH 6,0 nicht ist.



Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-201103							
t <sub>Mig</sub>	[min] $\beta$ -Lactoglobulin	3,087	2,854	3,319	0,628	20,344	0,39429
Fläche	[AU·min] $\beta$ -Lactoglobulin	89,381	69,508	109,255	53,654	60,029	2878,79344
korr. Fläche	[AU] $\beta$ -Lactoglobulin	27,093	22,719	31,467	11,809	43,586	139,44746
PM-LAC-051203							
t <sub>Mig</sub>	[min] $\beta$ -Lactoglobulin	4,399	4,232	4,565	0,434	9,856	0,18793
Fläche	[AU·min] $\beta$ -Lactoglobulin	154,886	145,074	164,697	25,526	16,480	651,56732
korr. Fläche	[AU] $\beta$ -Lactoglobulin	35,098	33,823	36,373	3,317	9,451	11,00197

Tabelle 5.6.2.2.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 bzw. 6,1

Im Vergleich zu den Resultaten, die man bei den Untersuchungen in unbeschichteten Kapillaren erhält, läßt sich das Phänomen der sich plötzlich verändernden Peakformen erneut beobachten. Die Ursache der Probleme scheint daher primär proteinimmanent und weniger von der Kapillaroberfläche beeinflusst zu sein.

RSD% relative Flächen		Neostigmin - Acetanilid	Neostigmin - $\beta$ -Lactoglobulin	Acetanilid - $\beta$ -Lactoglobulin
PM-LAC-201103		Acetanilid	nicht	detektierbar
AU	Protein	73,4		
korr. AU	Protein	67,710		
PM-LAC-051203				
AU	Kontrolle 1	4,220		
	Protein	5,782	10,058	8,137
	Kontrolle 2	6,808		
korr. AU	Kontrolle 1	4,230		
	Protein	2,995	8,619	9,067
	Kontrolle 2	7,552		

Tabelle 5.6.2.2.4: prozentuale RSD% der Peakflächenquotienten

### 5.6.2.3 Untersuchungen bei pH 6,5

Bei der Untersuchung des kapillarelektrophoretischen Verhaltens von  $\beta$ -Lactoglobulin in beschichteten Kapillaren werden weitere Versuchsreihen bei pH 6,5 durchgeführt. Als Hintergrundelektrolyt wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet (exp. Daten vgl. Kap. 9.5.5 und 9.5.6). Die verwendete Spannung beträgt in beiden Serien 20 kV, zusätzlich wird entweder ein Druck von 30 mbar (PM-LAC-011203) bzw. 40 mbar (PM-LAC-191103) angelegt. Bei der Auswertung der Meßdaten für die Systempräzision zu Beginn der Versuche (Acetanilid, Tab. 5.6.2.3.1) fällt auf, daß bei höherem Druck die Migrationszeiten erwartungsgemäß weniger schwanken, die Peakflächen hingegen stärker streuen als bei vermindertem Druck. Als mögliche Gründe für die Beobachtung kommen grundsätzlich Injektions- und Temperaturprobleme sowie Integrations-

fehler in Frage. Die Bildung der Flächenquotienten (vgl. Tab. 5.6.2.3.4) bringt keine Verbesserungen. Genauso wenig können Temperaturprobleme als Auslöser in Frage kommen, da die Migrationszeiten nur unwesentlich streuen. Vielmehr führen unregelmäßige Basislinienschwankungen zu den großen Abweichungen, da die Peakgrenzen immer wieder abweichend gesetzt werden.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-191103								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	3,168	3,158	3,178	0,028	0,880	0,00078
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	104,275	101,844	106,706	6,793	6,515	46,14580
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	32,931	32,121	33,740	2,262	6,870	5,11752
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	6,271	6,246	6,295	0,068	1,079	0,00458
PM-LAC-041203								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	3,952	3,935	3,970	0,049	1,237	0,00239
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	169,766	167,198	172,334	7,177	4,227	51,50579
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	42,964	42,276	43,652	1,922	4,474	3,69453
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,717	4,689	4,745	0,079	1,668	0,00619

Tabelle 5.6.2.3.1: Systempräzision, pH 6,5 (Serien PM-LAC-191103 u. PM-LAC-041203)

Auch bei der zweiten Meßreihe lassen sich durch die Bildung der Flächenquotienten keine bedeutsamen Verbesserungen (max. 0,4-0,8% RSD%) erreichen. Auch hier zeigt sich, daß die Peakbegrenzungen stärker schwanken als die Migrationszeiten und weisen somit auf Probleme bei der Integration hin.

In Abb. 5.61 sind einige Elektropherogramme der Meßreihe PM-LAC-041203 zusammengefaßt, welche zum Verständnis der Probleme beitragen, die bei der Auswertung der Serie auftreten. Während sich die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) sehr gut reproduzieren lassen (RSD%<0,76%), trifft dies nicht auf den Verlauf der Basislinie zu, der unregelmäßige Schwankungen aufweist. Prinzipiell treten bei allen Analyten Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Peakflächen auf. Je breiter aber der Peak ist, um so größer sind allerdings die Schwankungen und damit bei  $\beta$ -Lactoglobulin stärker als bei den Vergleichssubstanzen. Bei der Meßreihe PM-LAC-041203 sehen die ersten 15 Elektropherogramme ähnlich aus, auch in Bezug auf die unruhige Basislinie. Dann treten die gleichen Veränderungen des Peakmusters auf, wie bei pH 6,0 (Abb. 5.60, Lauf 25). Der Proteinpeak wird innerhalb weniger Läufe deutlich schmaler und höher und weist eine deutliche Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit auf. Auch in dieser Meßreihe kehrt sich die Migrationsreihenfolge von Globulin und EOF-Marker um. Diese extremen Veränderungen des Peakmusters innerhalb weniger Läufe führen dazu, daß nicht nur die Streuung

der Flächen zunimmt (vgl. Tab. 5.6.2.3.2 und 5.6.2.3.3), sondern auch die Signale für das Protein nicht integriert werden können.

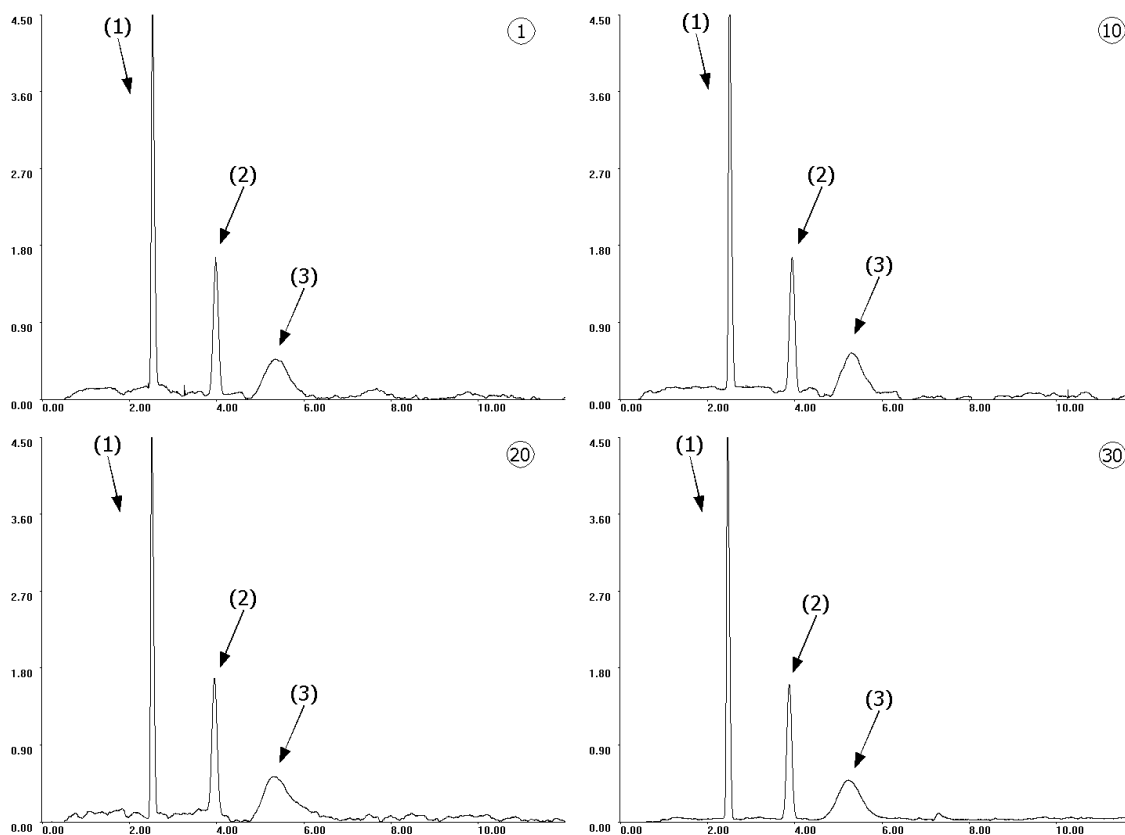


Abbildung 5.61:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; PM-LAC-041203)  
Phosphat-Puffer pH 6,5  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=30 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 84 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-191103							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	2,685	2,670	2,700	0,023	0,862	0,00054
Fläche [AU·min]	Acetanilid	104,806	80,596	129,016	37,057	35,358	1373,23500
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	39,092	29,989	48,195	13,934	35,643	194,14566
EOF [ $10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	7,679	7,627	7,731	0,080	1,038	0,00635
PM-LAC-041203							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,940	3,932	3,948	0,023	0,588	0,00054
Fläche [AU·min]	Acetanilid	156,335	154,317	158,352	5,638	3,606	31,78483
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	39,682	39,147	40,217	1,495	3,768	2,23538
EOF [ $10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,735	4,722	4,749	0,037	0,787	0,00139

Tabelle 5.6.2.3.2: Acetanilid, pH 6,5 (Serien PM-LAC-191103 u. PM-LAC-041203)

Bei pH 6,5 treten prinzipiell die gleichen Probleme auf wie bei pH 6,0. Die plötzlichen Formveränderungen des Proteinpeaks treten zufällig auf und lassen sich genauso wenig reproduzieren wie bei den Versuchen, die in unbeschichteten Kapillaren durchgeführt werden. Die Werte für den internen Standard und den EOF-Marker lassen sich bei Verwendung von beschichteten Kapillaren besser reproduzieren, für die Analytik des Proteins bringt es aber keine Vorteile.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
PM-LAC-191103							
$\beta$ -Lactoglobulin	nicht auswertbar						
PM-LAC-041203							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	5,304	5,289	5,318	0,040	0,761	0,00163
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	228,814	220,332	237,296	23,306	10,185	543,16182
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	43,150	41,532	44,769	4,448	10,308	19,78234

Tabelle 5.6.2.3.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (Serien PM-LAC-191103 u. PM-LAC-041203)

Die Berechnung der Flächenquotienten bringt nur geringfügige Verbesserungen (s. Tab. 5.6.2.3.4). Da die Hauptfehlerquelle in den Schwankungen der Basislinie zu sehen ist und sich diese Einflußgröße verschieden stark auf die verschiedenen Substanzen auswirkt, lassen sich die auf das Protein bezogenen Werte nicht verbessern.

RSD% relative Flächen		Neostigmin - Acetanilid	Neostigmin - $\beta$ -Lactoglobulin	Acetanilid - $\beta$ -Lactoglobulin
PM-LAC-191103				
AU	Kontrolle 1	6,533		
	Protein	42,813		
	Kontrolle 2	5,983		
korr. AU	Kontrolle 1	6,560		
	Protein	42,825		
	Kontrolle 2	5,202		
PM-LAC-041203				
AU	Kontrolle 1	3,619		
	Protein	3,139	10,790	10,358
	Kontrolle 2	2,360		
korr. AU	Kontrolle 1	3,674		
	Protein	3,210	10,926	10,470
	Kontrolle 2	2,404		

Tabelle 5.6.2.3.4: prozentuale RSD% der Peakflächenquotienten

#### 5.6.2.4 Untersuchungen bei pH 7,0

Abschließend wird eine weitere Meßreihe bei pH 7,0 durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Reproduzierbarkeit bei diesem pH-Wert ähnlich verbessert wie bei der Verwendung von Kieselglaskapillaren. Aus diesem Grund wird auch bei dieser Reihe ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Trennung wird bei einer Spannung von 20 kV und einem Druck von 40 mbar durchgeführt (vgl. auch Kap. 9.5.7). Die in Tab. 5.6.2.4.1 zusammengestellten Ergebnisse zeigen keine ungewöhnlichen Schwankungen, auch ist der Verlauf der Basislinie unauffällig.

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,696	2,689	2,703	0,020	0,744	0,00040
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	99,230	98,291	100,170	2,626	2,646	6,89592
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	36,806	36,432	37,181	1,046	2,842	1,09410
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	7,639	7,615	7,664	0,068	0,896	0,00469

Tabelle 5.6.2.4.1: Systempräzision, pH 7,0 (PM-LAC-181103)

Bei der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin treten große Schwankungen bei den Migrationszeiten auf. Davon ist nicht nur der EOF-Marker betroffen (Tab. 5.6.2.4.2), sondern auch der interne Standard und das Globulin. Während die Peakfläche als von der Migrationsgeschwindigkeit abhängige Größe ebenfalls deutliche Abweichungen zeigt, sind diese bei den korrigierten Flächen merklich geringer.

Experiment Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	1,745	1,659	1,831	0,236	13,508	0,05556
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	67,647	63,689	71,606	10,876	16,077	118,28097
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	38,692	38,128	39,256	1,549	4,004	2,39956
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	12,849	12,290	13,408	1,536	11,954	2,35930

Tabelle 5.6.2.4.2: Acetanilid, pH 7,0 (PM-LAC-181103)

Durch Bildung der Flächenquotienten von Neostigmin und Acetanilid auf läßt sich die Streuung der korr. AU-Werte sogar auf 1,60% reduzieren. Daraus läßt sich schließen, daß Injektionsfehler zur Gesamtstreuung beitragen. Es erklärt aber nicht, warum die Migrationszeiten während der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin stark streuen. Die Abweichungen sind bei den Kontrollversuchen wesentlich geringer, die vorher und nachher durchgeführt werden. Analysiert man die Elektropherogramme (Abb. 5.62), kommt man zu einigen zusätzlichen Erkenntnisse. Sowohl bei Neostigmin (1) als auch Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3a) nehmen in den Läufen 1-5 die Migrationsgeschwindigkeiten zunächst zu, bleiben bis etwa zum 23. Lauf konstant und fallen anschließend ab. In den Läufen 5 bis 21 beobachtet man außerdem einen weiteren Peak (3b).

Außerdem fällt auf, daß sich die Peakbreite des makromolekularen Analyten in den ersten drei Läufen verändert, die korrigierte Fläche hingegen über den gesamten Untersuchungszeitraum weitestgehend konstant bleibt (RSD% ~5%, s. Tab. 5.6.2.4.3). Da sich die Meßwerte der Proteinfraktion 3a nicht anders verhalten als beispielsweise bei Nicotinsäure, kann man annehmen, daß es sich um ein stabiles, schwach negativ geladenes Konformer handelt, das nur geringe Tendenz zur Adsorption an der Polyacrylamid-Beschichtung aufweist. Die zweite Fraktion 3b hingegen besitzt eine deut-

lich größere Nettomobilität, die entweder durch einen geringeren Radius des Moleküls oder durch eine höhere Anzahl von negativen Ladungen erklärt werden kann. Aufgrund des ausgeprägten Tailings scheint die Fraktion Wechselwirkungen mit der Kapillarbeschichtung einzugehen, was zu einer scheinbaren Erhöhung von  $\mu_{\text{eff}}$  führt.

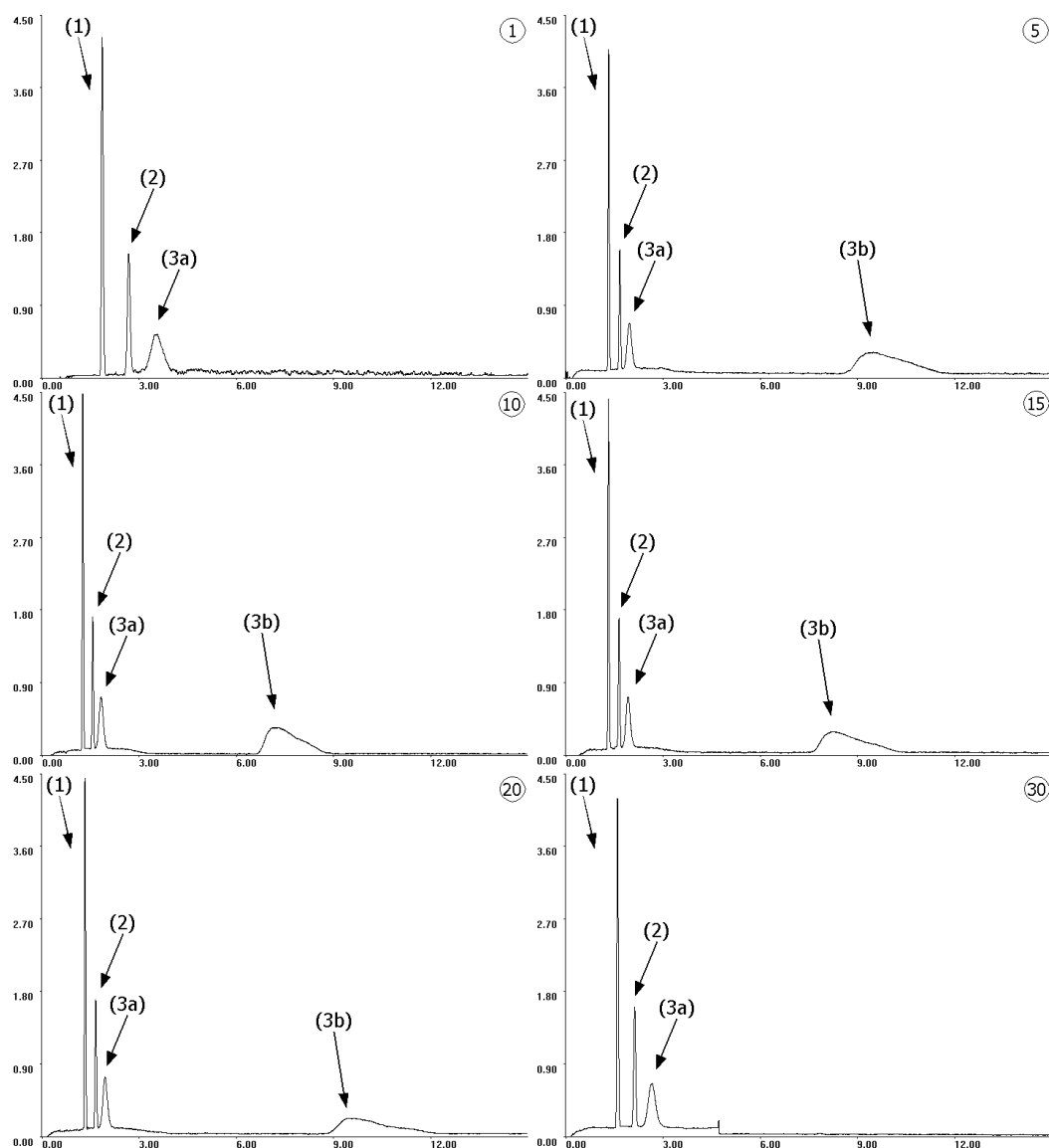


Abbildung 5.62:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; PM-LAC-041203)  
Phosphat-Puffer pH 7,0  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 97 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	2,078	1,947	2,209	0,361	17,377	0,13039
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	75,941	71,116	80,767	13,257	17,457	175,75609
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	36,572	35,913	37,230	1,810	4,950	3,27652
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	8,212	7,741	8,684	0,991	12,067	0,98205
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	224,492	202,035	246,949	47,242	21,044	2231,78818
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	28,233	24,287	32,179	8,300	29,400	68,89774

Tabelle 5.6.2.4.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 7,0 beide Fraktionen (PM-LAC-181103)

Im Gegensatz zur Fraktion 3a streuen die Flächen-Werte der zweiten  $\beta$ -Lactoglobulin-Fraktion 3b erheblich mehr. Bezieht man die Daten des Proteins auf die Flächen von Neostigmin oder Acetanilid des jeweiligen Laufes, werden die Unterschiede noch deutlicher. Bei der langsamer migrierenden Fraktion steigen die RSD% sogar deutlich an ( $\sim 33\%$  AU bzw.  $\sim 44\%$  korr. AU), während sie für die andere merklich abnehmen.

RSD% relative Flächen		Neostigmin - Acetanilid	Neostigmin - $\beta$ -Lactoglobulin	Acetanilid - $\beta$ -Lactoglobulin
PM-LAC-181103				
AU	Kontrolle 1	2,780		
	Protein	4,016	5,445 / 32,505	2,735 / 32,779
	Kontrolle 2	2,157		
korr. AU	Kontrolle 1	2,759		
	Protein	1,603	2,608 / 43,604	3,156 / 43,726
	Kontrolle 2	2,198		

Tabelle 5.6.2.4.4: RSD% der Peakflächenquotienten; Werte bezogen auf die 1. / 2. Proteinfraktion

Bei den abschließenden Kontrollläufen nehmen die Migrationszeiten zwar zu, erreichen aber nicht die Ausgangswerte aus der Bestimmung der Systempräzision. Diese Beobachtung läßt sich darauf zurückführen, daß entweder der vom Gerät angelegte Druck abnimmt, oder daß sich der Strömungswiderstand in der Kapillare verändert.

### 5.6.2.5 Diskussion der Teilergebnisse

Die durchgeführten Versuche mit  $\beta$ -Lactoglobulin in beschichteten Kapillaren zeigen, daß die Wiederholpräzision unter kritischen Bedingungen im Bereich zwischen pH 5,3 und 7,0 im Vergleich zu den Meßreihen in unbeschichteten Kapillaren besser ist. Das trifft insbesondere für die Untersuchungen bei pH 5,3-5,5 zu, da alle relevanten Parameter weitaus geringeren Schwankungen unterliegen. Noch wichtiger ist, daß  $\beta$ -Lactoglobulin sich auch im Bereich um den IP detektieren und quantifizieren läßt. Die Präzision ist aus kontrollanalytischer Sicht unzureichend, allerdings sind die Versuchsbedingungen nicht weiter optimiert worden, so daß die RSD%-Werte der Flächen noch nicht die Grenzen der kapillarelektrophoretischen Bestimmungsmöglichkeiten darstellen. Allerdings zeigen die Meßreihen auch deutlich, daß die Schwierigkeiten bei pH 6,0 bis 6,5 sich nicht auf unbeschichtete Kapillaren beschränken.

Die Adsorptionsprobleme beeinflussen die Migrationszeiten in geringerem Maße als bei den entsprechenden Versuchen in Kieselglaskapillaren. Die in Abb. 5.63 abgebildeten Diagramme beruhen auf der Berechnung des EOF nach Gl. 27 und stellen folg-

lich nur Näherungen dar. Man muß dabei berücksichtigen, daß sowohl Schwankungen der kinematischen Viskosität  $\eta$  als auch des Druckes leicht zu falschen Ergebnissen führen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, daß zunächst die Systempräzision bestimmt wird, um die geräteimmanenten Schwankungen zu ermitteln. Bei den durchgeführten Meßreihen zeigen die Kontrollversuche meist Streuungen von weniger als 2% RSD%. Im Gegensatz dazu treten bei der Analytik von  $\beta$ -Lactoglobulin deutliche Schwankungen auf, insbesondere bei pH 6,0 und 7,0.

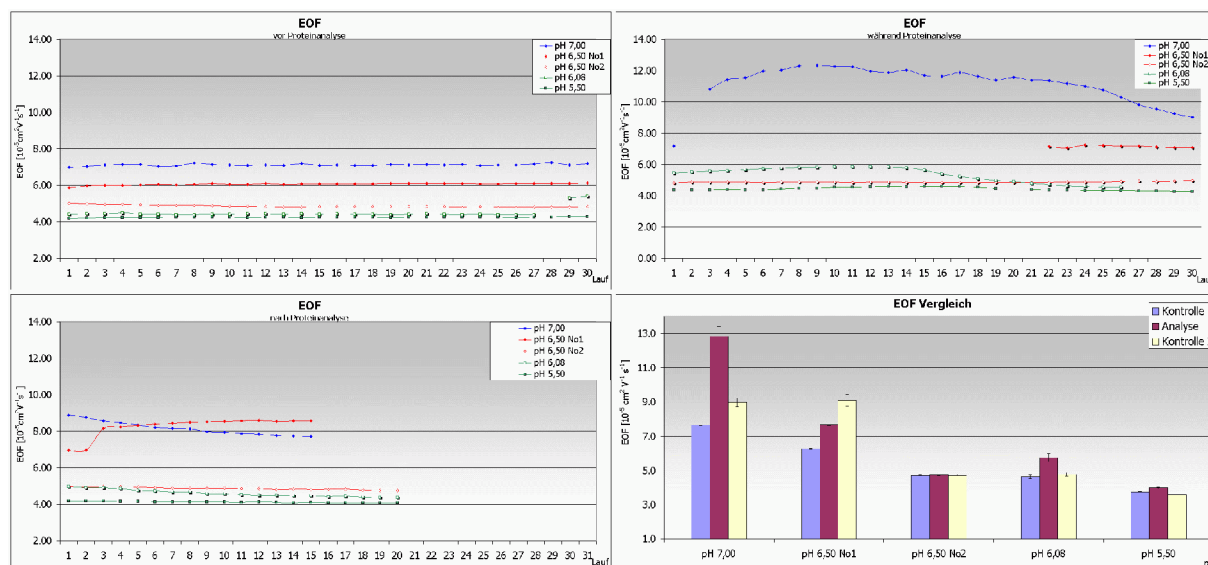


Abbildung 5.63: Ergebnisse EOF-Marker

Während bei pH 6,0 die Abnahme des EOF eine vergleichbare Auswirkung der Proteinadsorption darstellt, wie sie auch in unbeschichteten Kapillaren auftritt. Die Meßreihe bei pH 7,0 unterscheidet sich davon, weil die elektroosmotische Mobilität innerhalb weniger Läufe stark zunimmt, sich dann stabilisiert und dann gegen Ende der Proteinuntersuchungen abfällt. Bei der abschließenden Kontrollreihe sinkt der Meßwert auf das Niveau der vorausgegangenen Versuche. Ein ähnliches beobachtet man bei pH 5,5 (vgl. Balkendiagramme in Abb. 5.63), wenn auch nicht so ausgeprägt.

Um diese ungewöhnliche Entwicklung des  $\mu_{\text{EOF}}$  zu erklären, muß man die Ergebnisse der Proteinmessungen hinzuziehen. Um die AU- und korr. AU-Werte graphisch besser vergleichen zu können, werden die Einzelwerte auf das arithmetische Mittel bezogen. Dazu wird anstelle des absoluten Wertes der Prozentsatz im Diagramm aufgetragen (Abb. 5.64). Bei dieser Darstellungsweise fällt auf, daß die Schwankungen bei pH 6,0 mit Abstand am größten sind, was auf die Veränderung der Peakform und auf die teilweise Überlagerung mit dem Acetanilid-Peak zurückzuführen ist. Bei pH 7,0 ist nur



die erste Proteinfraktion gut reproduzierbar, während die langsamer migrierende ähnliche große Abweichungen aufweist wie bei pH 6,0.

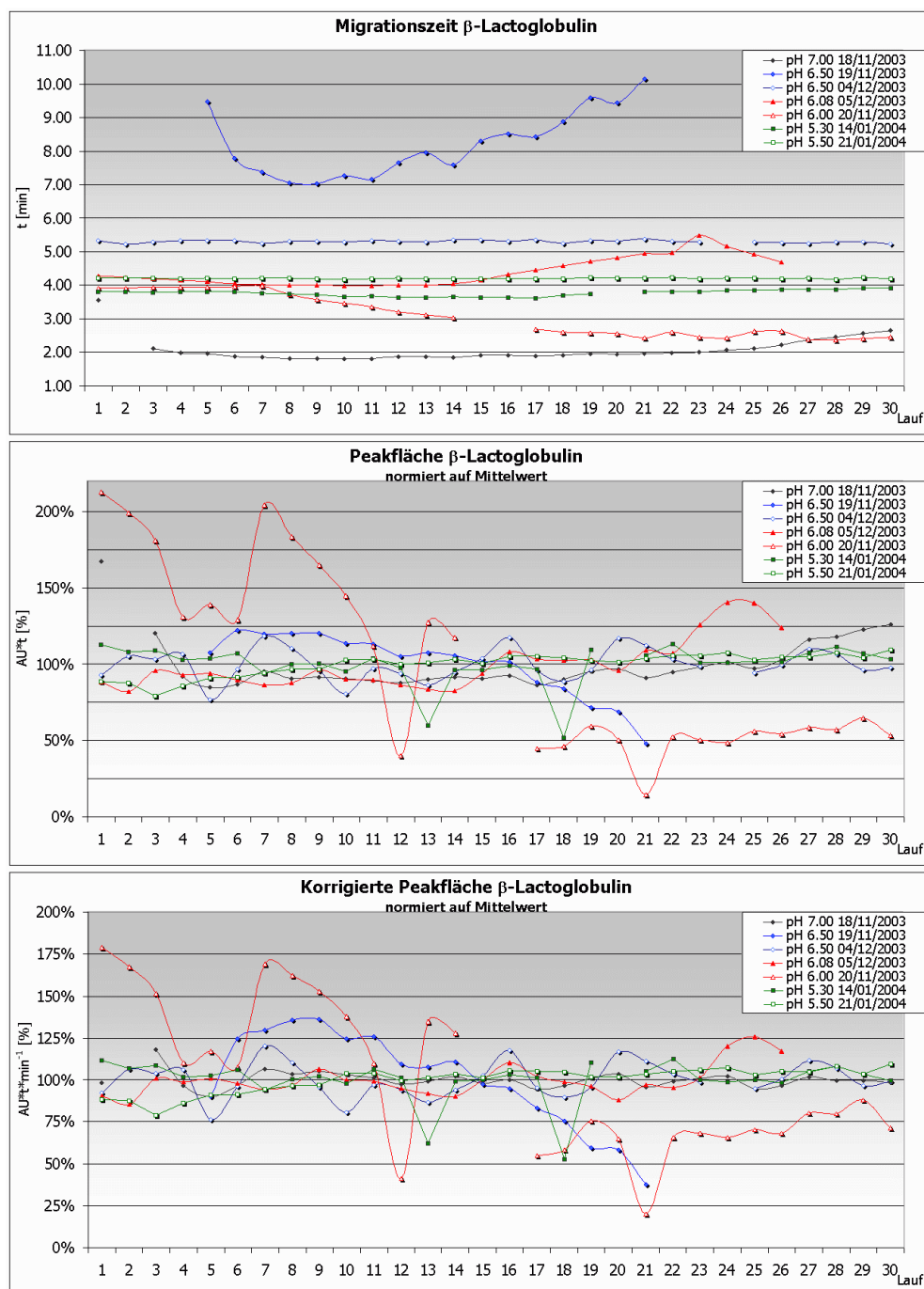


Abbildung 5.64: Ergebnisse  $\beta$ -Lactoglobulin in LPA-beschichteten Kapillaren

Aus den Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß die Probleme, die bei pH 6,0 und 6,5 auftreten, durch nicht reproduzierbare Prozesse ausgelöst werden, die unabhängig von der Kapillaroberfläche sind. Sie treten in Gegenwart von geladenem Kieselglas genauso auf wie an wenig polaren Polyacrylamid-Grenzflächen. Die Annahme, daß Mängel in der Beschichtung der Kapillare der Auslöser für die Probleme sein, läßt

sich aufgrund der berechneten  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte aus der Systempräzision nicht belegen, da in Anwesenheit von unbeschichteten oder nur teilweise bedeckten Kieselglasarealen deren Beitrag zur resultierenden elektroosmotischen Mobilität deutlichere Auswirkungen haben müßte. Vielmehr scheint im Fall von  $\beta$ -Lactoglobulin die Tertiär-/Quartärstruktur unter den Versuchsbedingungen äußerst labil zu sein. Durch die postulierten Konformationsänderungen, die beim Übergang von saurem zu schwach alkalischem Milieu auftreten [136], ist es möglich, daß die hydrophoben Kernbereiche des Proteins mit der Polyacrylamid-Schicht Wechselwirken können und das Protein dadurch adsorbiert. Ähnliche Probleme sind bei der HI-Chromatographie beschrieben worden. Dort haften Proteine mit großen GRAVY-Scores relativ stark an unpolaren Flächen, da die gesamte Proteinstruktur kollabiert. Die resultierenden Zufallskonformere ordnen sich so an, daß die unpolaren Seitenketten zur stationären Phase ausgerichtet sind, während die ionischen Gruppen in die polare, mobile Phase reichen [135].

Ein anderer Punkt, der in den bisherigen Untersuchungen noch nicht beobachtet werden konnte, ist das Auftreten einer zweiten Proteinfraction in LPA-beschichteten kapillaren bei pH 7,0. Aufgrund der deutlichen Neigung, an der unpolaren Oberfläche zu adsorbieren, läßt sich nicht abschätzen, wie groß die Ladung des Proteins ist, zumal unklar ist, ob es sich um Mono-, Di- oder Oligomere handelt. Es ist aber wahrscheinlich, daß die Konformation dieses Analyten deutlich von derjenigen des nativen  $\beta$ -Lactoglobulins abweicht. Unterstellt man, daß die Anzahl der negativen Ladungen nicht deutlich erhöht ist gegenüber der nativen Form unter isohydrischen Bedingungen, läßt sich der signifikante Unterschied in der scheinbaren Mobilität nur durch einen geringeren Stokes-Radius erklären. Anzeichen, die für den Ablauf von Abbaureaktionen wie Deamidierungen, Hydrolyse von Peptidbindungen, etc. sprechen, lassen sich nicht finden, da in den Elektropherogrammen keine vereinzelt auftretenden Spikes beobachtet werden.

### 5.6.3 Langzeituntersuchungen an beschichteten Kapillaren

Die in Kapitel 5.6.2 durchgeführten Untersuchungen sind jeweils in einer neuen Kapillare durchgeführt worden, um vergleichbare Ausgangsbedingungen bei jeder Meßreihe zu haben. Dadurch lassen sich die Ergebnisse direkt mit den Resultaten aus Kapitel 5.5 vergleichen. In der Praxis werden beschichtete Kapillaren über einen we-

sentlich längeren Zeitraum als 80-90 Läufe verwendet, da der finanzielle Aspekt in der Routineanalytik eine wichtige Rolle spielt. Folglich ist es notwendig, die Langzeitpräzision der Kapillaren gezielt zu untersuchen, um auch die zeitlichen Veränderungen von system- und proteinimmanenten Fehlerquellen einschätzen zu können. Eine Kapillare wird deshalb für mehrere, aufeinander folgende Meßreihen verwendet und am Ende der Meßreihe mit bidestilliertem Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet. Um die Stabilität und Leistungsfähigkeit der Beschichtung in Hinblick auf die Proteinadsorption zu untersuchen, wird  $\beta$ -Lactoglobulin bei pH-Werten von 6,0 bis 7,0 untersucht. Die bisherigen Versuchsreihen (vgl. Kap. 5.6.2) zeigen, daß die Proteinstruktur wenig stabil ist und es zur Adsorption des Proteins an der Kapillaroberfläche kommt. Unter den kritischen Bedingungen lassen sich die anti-adhäsiven Eigenschaften der Beschichtung testen. Gleichzeitig sind die Puffersysteme so gewählt, daß eine zusätzliche Belastung des Polymers durch extreme pH-Werte vermieden wird.

### 5.6.3.1 Untersuchungen bei pH 6,5

Zu Beginn der Untersuchungen (vgl. Kap. 9.4) wird zunächst die Systempräzision aus 30 Läufen bestimmt. Bei den Kontrollmessungen wird eine Spannung von 15 kV und ein Druck von 90 mbar getestet. Die in Tab. 5.6.3.1.1 zusammengefaßten Werte zeigen, daß die Kombination aus geringerer Feldstärke und höherem Druck sich negativ auf die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Flächen auswirkt. Da auch die korrigierten Flächen deutlich schwanken, werden die verschiedenen Flächenquotienten gebildet. Die Streuung der Werte läßt sich dadurch zwar auf 2,47 bis 4,31% RSD% reduzieren. Es zeigt aber auch, daß eine hohe Trennspannung für die Reproduzierbarkeit in diesem Kapillartyp (vgl. Kap. 9.4.1 und 9.5) Voraussetzung ist.

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	3,670	3,574	3,767	0,260	7,089	0,06771
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	63,884	62,879	64,890	2,714	4,249	7,36809
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	17,449	17,163	17,735	0,771	4,420	0,59486
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,902	4,765	5,039	0,369	7,520	0,13590
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	23,886	23,476	24,296	1,086	1,180	1,17983
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	4,891	4,775	5,008	0,310	6,334	0,09600
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,885	1,704	2,067	0,490	25,969	0,23970
$t_{\text{Mig}}$	[min]	N-Butyl-Scopolamin	3,914	3,811	4,018	0,280	7,142	0,07816
Fläche	[AU·min]	N-Butyl-Scopolamin	17,249	16,941	17,557	0,832	4,823	0,69202
korr. Fläche	[AU]	N-Butyl-Scopolamin	4,419	4,332	4,505	0,234	5,286	0,05455

Tabelle 5.6.3.1.1: Systempräzision (U=15 kV, p=90 mbar, pH 6,5, BR-LAC-210503)

Bei der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin wird die Spannung auf 20 kV erhöht und der Druck auf 40 mbar reduziert. Dies führt in den Kontrollversuchen der Meßreihe BR-LAC-260503 dazu, daß die Streuung der Migrationszeiten abnimmt. Im Vergleich zum ersten System-Test schwanken der Peakflächen und korrigierten Peakflächen genauso stark. Auch der Bildung der Quotienten von AU- und korr. AU-Werten bringt keine Verbesserung (vgl. Tab. 5.6.3.1.2).

BR-LAC-260503		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	7,298	7,179	7,418	0,193	2,643	0,03721
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	31,638	31,064	32,212	0,926	2,927	0,85784
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	4,338	4,228	4,448	0,177	4,092	0,03151
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	1,731	1,677	1,785	0,087	5,006	0,00751
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	8,247	8,006	8,488	0,673	8,165	0,45344
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	36,395	34,676	38,114	4,804	13,199	23,07571
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	4,442	4,204	4,680	0,666	15,000	0,44394
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	1,370	1,284	1,455	0,240	17,489	0,05737

Tabelle 5.6.3.1.2: EOF-Marker, pH 6,5 (BR-LAC-260503)

Die Untersuchung des Proteins bestätigt die Ergebnisse aus den vorausgegangenen Messungen. Die Elektropherogramme dieser Versuchsreihe zeigen (s. Abb. 5.65), daß die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) zunehmen. Weiterhin läßt sich schon zu Beginn der Untersuchungen die Verunreinigung des Acetanilids (2a) detektieren, was auf den sehr geringen EOF (vgl. Tab. 5.6.3.1.2) zurückzuführen ist. Die Veränderung der Form des Proteinpeaks läßt sich auch bei dieser Versuchsreihe beobachten; in Lauf 30 tritt ein zweiter Proteinpeak auf (vgl. Kap. 5.6.2.4). Dieser wird aber nur teilweise detektiert, weil diese Fraktion erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums das Detektionsfenster passiert.

Experiment		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	14,886	13,686	16,086	3,123	20,979	9,75239
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	75,752	64,569	86,935	29,094	38,406	846,44092
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	5,622	4,457	6,786	3,030	53,907	9,18344

Tabelle 5.6.3.1.3:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (BR-LAC-260503)

Die mit der Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit verbundene Streuung der Migrationszeiten und Peakflächen läßt sich bei allen Analyten beobachten, wobei Acetanilid und  $\beta$ -Lactoglobulin hiervon stärker betroffen sind als Neostigmin. Es fällt auf, daß die korrigierten Peakflächen von EOF-Marker und internem Standard mit 10-15% RSD% behaftet sind. Die Meßwerte für das Protein schwanken aber noch wesentlich

stärker (Tab. 5.6.3.1.3). Auch in Relation zu den Peakflächen der Vergleichssubstanzen bleibt die Streuung praktisch unverändert.

Man muß daher von einer deutlichen Proteinadsorption bei pH 6,5 in LPA-beschichteten Kapillaren ausgehen. Im Anschluß an die Meßreihe wird die Kapillare mit Wasser gespült und im Luftstrom getrocknet.

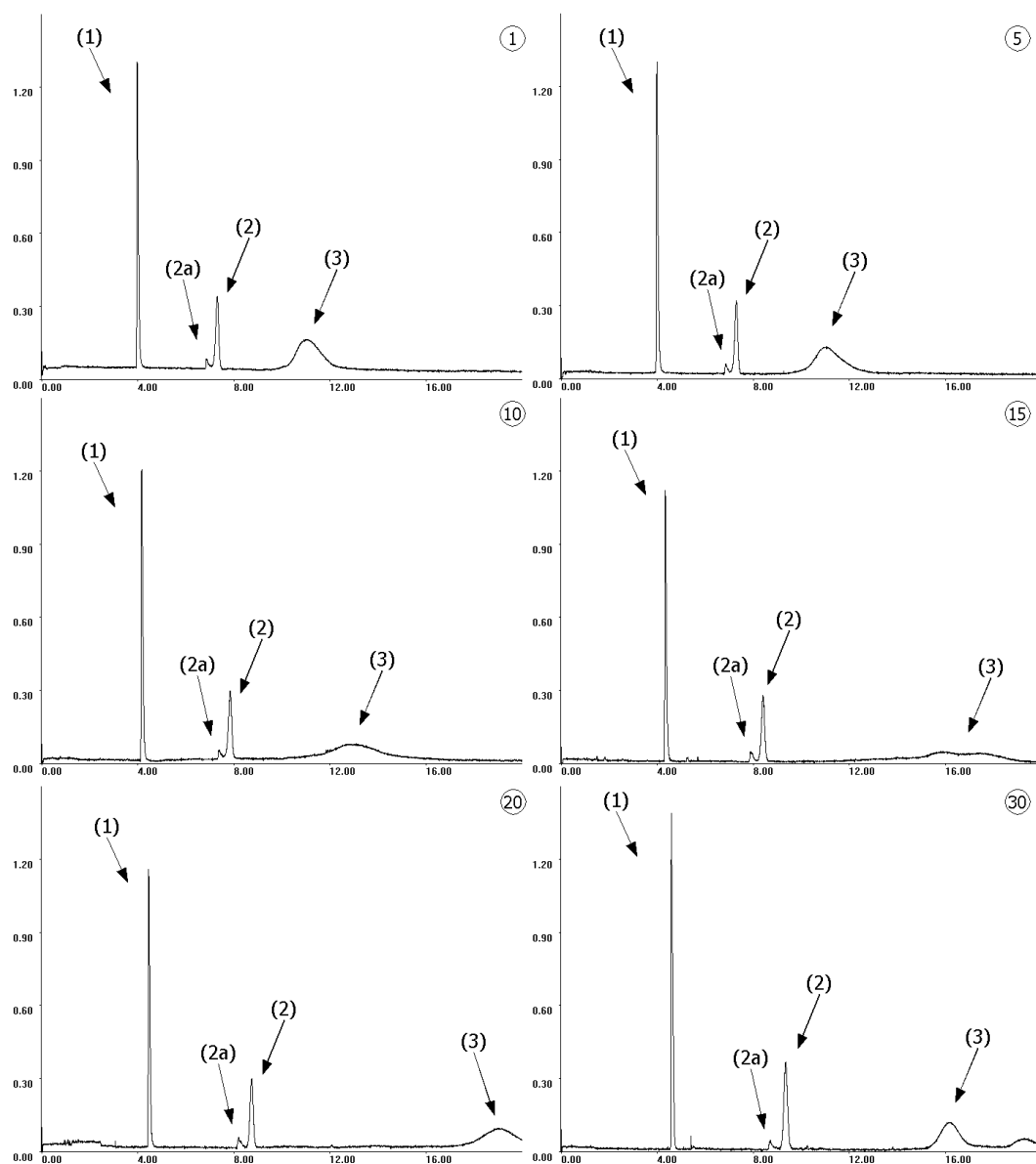


Abbildung 5.65:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; BR-LAC-260503)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 85 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

### 5.6.3.2 Untersuchungen bei pH 7,0

Im Anschluß wird  $\beta$ -Lactoglobulin bei pH 7,0 untersucht, wobei man einen 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 20 kV und einem Druck von 40 mbar durchgeführt. In Tab. 5.6.3.2.1 sind die Ergebnisse

der Kontrollversuche zur Bestimmung der Systempräzision zusammengefaßt. Die Abweichungen der Migrationszeiten liegen mit etwa 4% RSD% über den Resultaten des System-Tests der Meßreihe bei pH 6,5. Bei der Meßreihe BR-LAC-020603 wird das Ergebnis von Acetanilid durch einen Ausreißer verfälscht, der durch einen Versatz der Basislinie im Bereich des Substanzpeaks verursacht wird. Bleibt der Wert unberücksichtigt, reduzieren sich die Schwankungen auf 24,2% (AU) bzw. 28,5% (korr. AU). Bei der Meßreihe BR-LAC-030603 beobachtet man in den Kontrollversuchen ebenfalls deutlich größere Schwankungen der Flächenwerte als in der Vergleichsserie PM-LAC-181103. In den Elektropherogrammen der Kontrollläufe (Serie BR-LAC-020603) treten vereinzelt Schwankungen in der Basislinie auf, welche durch die Integrationssoftware nicht kompensiert werden können und deshalb Ausreißer bei den Werten liefern.

BR-LAC-020603		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,732	4,611	4,853	0,185	3,917	0,03436
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	34,668	22,889	46,447	18,030	52,007	325,06990
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,368	4,856	9,881	3,845	52,183	14,78446
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,168	2,429	3,907	1,131	35,711	1,27980
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,815	4,785	4,846	0,047	0,973	0,00220
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	39,318	20,609	58,027	28,637	72,833	820,05400
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,181	4,259	12,103	6,003	73,384	36,04063
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,425	3,394	3,457	0,048	1,405	0,00231

Tabelle 5.6.3.2.1: Systempräzision, pH 7,0 EOF-Marker

Bei der Untersuchung des Proteins in Reihe BR-LAC-020603 lassen sich die Migrationszeiten aller Analyte sehr gut reproduzieren und schwanken zwischen 0,78% bei Neostigmin (1) und 1,46% RSD% bei  $\beta$ -Lactoglobulin (3). Auch bei Neostigmin sind die Ergebnisse der AU und korr. AU im Vergleich zu den Kontrollläufen besser. Die Werte der RSD% liegen beim internen Standard und  $\beta$ -Lactoglobulin im Bereich von 1,51% bis 2,98%. Die Streuung der Flächen bei Acetanilid (s. Tab. 5.6.3.2.1) wird durch einen Ausreißer verursacht, der aus einem Versatz der Basislinie während des Substanzpeaks im fünften Lauf auftritt. Ohne diesen Lauf liegt die RSD% der Flächen bei 3,70% und die der korrigierten Flächen bei 4,56%. Die Versuchsreihe BR-LAC-020603 bricht durch einen Fehler in der Gerätesteuerung nach dem neunten Lauf ab. Die Messungen werden mit einer frisch hergestellten Probe erneut durchgeführt, wobei die Migrationszeiten stärker schwanken und Acetanilid kritischer reagiert als Neostigmin (Tab. 5.6.3.2.2). Die Flächen lassen sich ebenfalls schlechter reprodu-

zieren. Im Fall von Acetanilid sind erneut Basislinienschwankungen, die in einigen Läufen nach dem Substanzpeak auftreten, der Grund für die schlechte Präzision.

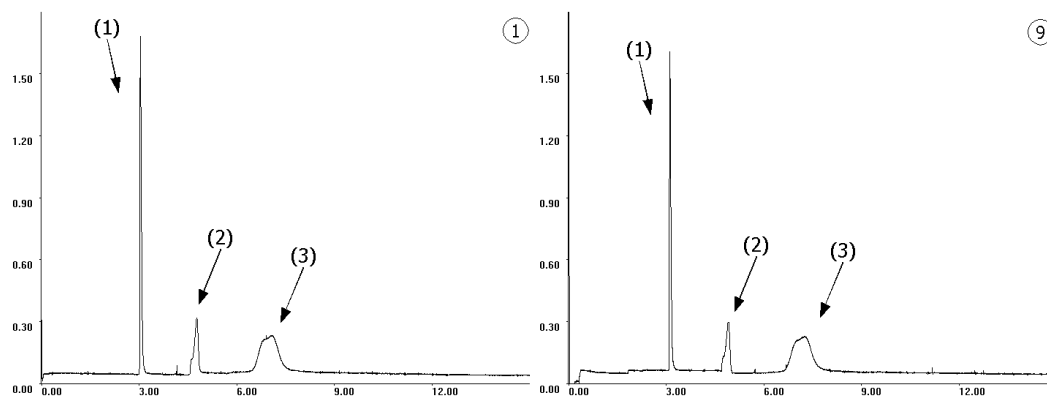


Abbildung 5.66:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; BR-LAC-020603)  
Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 104 \mu\text{A}$ ; Läufe 1 und 9  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

BR-LAC-030603			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Neostigmin	2,748	2,683	2,813	0,100	3,644	0,01002
Fläche	[AU·min]		Neostigmin	56,309	55,828	56,791	0,737	1,309	0,54333
korr. Fläche	[AU]		Neostigmin	20,508	20,159	20,857	0,534	2,602	0,28483
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	4,123	4,013	4,234	0,169	4,106	0,02867
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	30,041	27,733	32,348	3,532	11,758	12,47701
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	7,278	6,831	7,725	0,684	9,402	0,46823
EOF	$[10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$		Acetanilid	4,270	4,117	4,422	0,233	5,456	0,05427
Experiment									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	4,801	4,503	5,100	0,681	14,186	0,46390
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	22,072	20,064	24,080	4,582	20,758	20,99239
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	4,784	4,149	5,419	1,449	30,286	2,09960
EOF	$[10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$		Acetanilid	3,530	3,233	3,826	0,677	19,176	0,45818

Tabelle 5.6.3.2.2: Ergebnisse pH 7,0 Acetanilid / Neostigmin

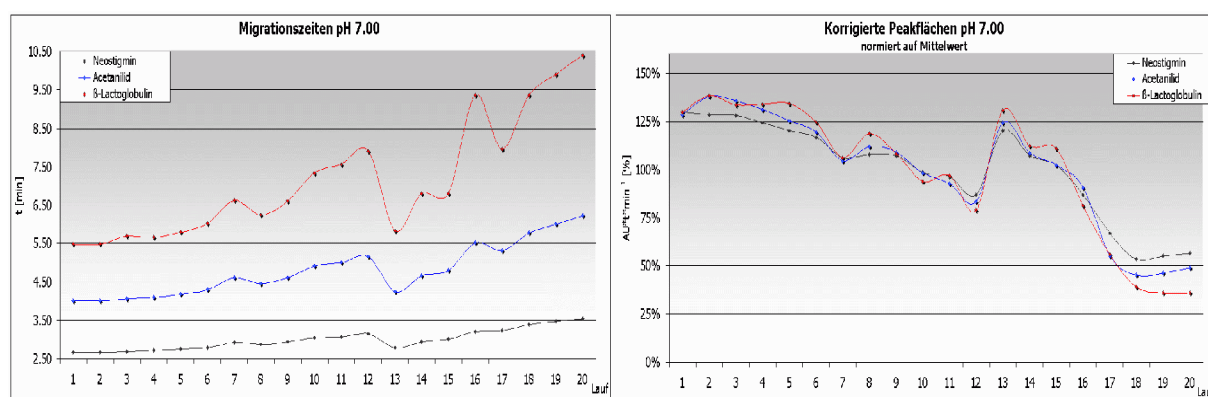


Abbildung 5.67: Ergebnisse  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 7,0 BR-LAC-030603

Während der Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin beobachtet man bei den Migrationszeiten aller Analyten erkennbare Schwankungen in den ersten Läufen. Allerdings verzeichnet ab dem 13. Lauf eine deutliche Zunahme (vgl. Abb. 5.67). Um die korrigier-

ten Flächen leichter miteinander vergleichen zu können, werden die Werte auf den Mittelwert normiert. Die graphische Darstellung zeigt, daß sich im Verlauf der Messungen das injizierte Probenvolumen fortlaufend ändert. Die Elektropherogramme (s. Abb. 5.68) zeigen auch deutlich, daß die Peakhöhen des internen Standards (1) und EOF-Markers (2) abnehmen, während bei  $\beta$ -Lactoglobulin (3) der Peak breiter wird. Die RSD%-Werte der korrigierten Flächen liegen zwischen 25 und 35%. Nimmt man die Ergebnisse der Kontrollversuche zum Maßstab, läßt sich nur ein Teil der Streuung durch das CE-System erklären, zumal die Werte aus der Systempräzision gleichmäßig

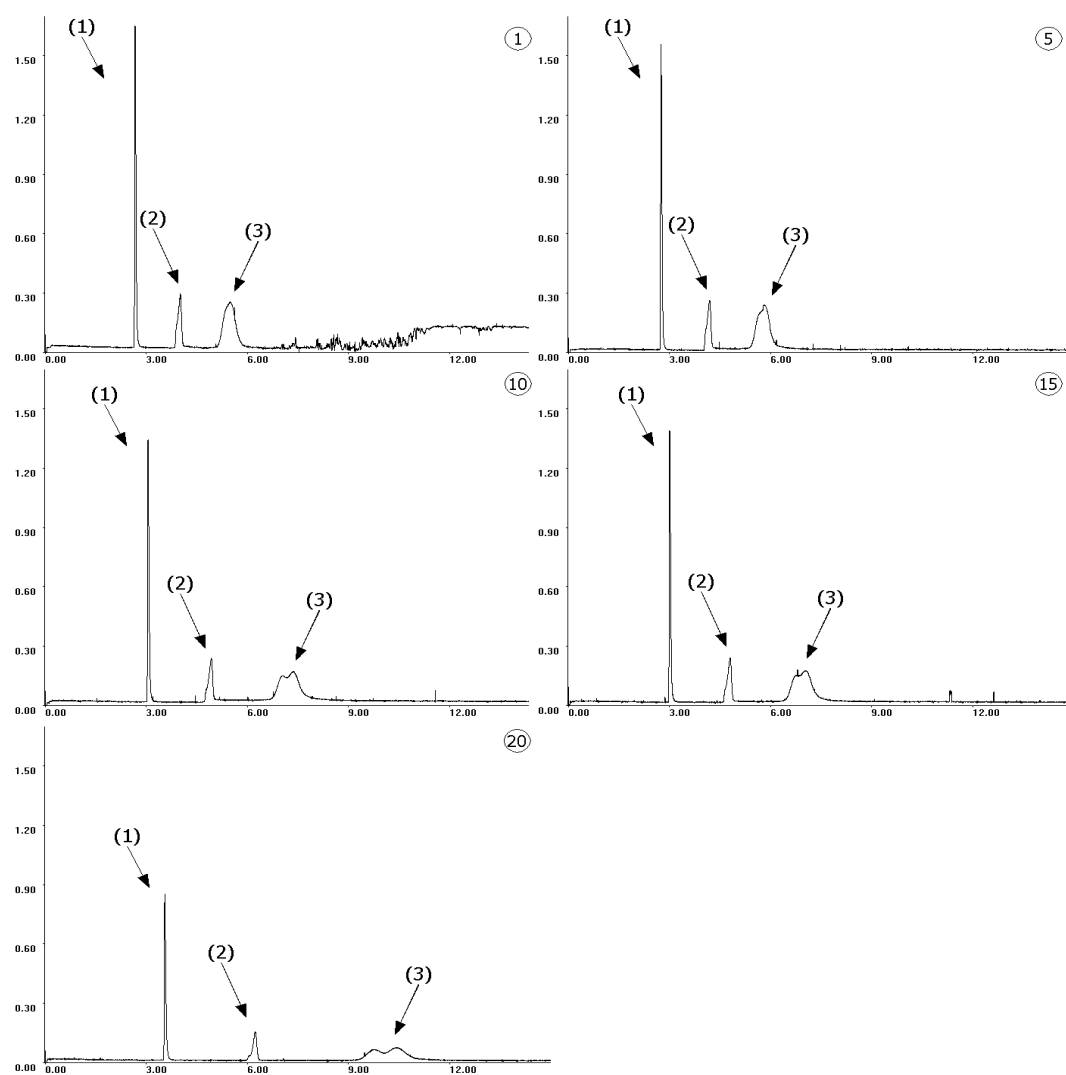


Abbildung 5.68:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; BR-LAC-020603)  
Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 104 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

um deren Mittelwert verteilt liegen. Die in der graphischen Darstellung der Versuchsreihe zeigt eine abnehmende Tendenz der relativen korr. AU-Werte. Im Gegensatz dazu streuen die Quotienten der korrigierten Flächen weniger und zeigen keine deutlich erkennbare Veränderung. Daher scheint sich die Zusammensetzung der Probe,



insbesondere der Proteinanteil, nicht zu verändern. Vielmehr wird ein geringeres Volumen der Lösung injiziert. Temperaturschwankungen können ähnliche Phänomene verursachen (vgl. Cytochrom C, Kap. 5.3.6), reichen aber nicht aus, um derartige Streuungen zu verursachen. Daher kann man annehmen, daß der Strömungswiderstand in der Kapillare zunimmt, was wiederum im Zusammenhang mit der Proteinadsorption zu sehen ist.

Die Ergebnisse aus den Meßreihen bei pH 7,0 zeigen, daß sich selbst die Reproduzierbarkeit des Peakmasters innerhalb weniger Läufe deutlich verschlechtern kann. Die Resultate in beschichteten Kapillaren sind außerdem bei pH 7,0 deutlich schlechter als in unbeschichteten Kapillaren.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
BR-LAC-020603							
t <sub>Mig</sub> [min]	β-Lactoglobulin	7,091	7,023	7,158	0,103	1,456	0,01066
Fläche [AU·min]	β-Lactoglobulin	72,293	71,359	73,227	1,429	1,977	2,04319
korr. Fläche [AU]	β-Lactoglobulin	10,199	10,001	10,397	0,303	2,976	0,09211
BR-LAC-030603							
t <sub>Mig</sub> [min]	β-Lactoglobulin	7,143	6,463	7,823	1,552	21,729	2,40913
Fläche [AU·min]	β-Lactoglobulin	55,640	50,176	61,105	12,468	22,409	155,46208
korr. Fläche [AU]	β-Lactoglobulin	8,362	7,090	9,634	2,902	34,712	8,42448

Tabelle 5.6.3.2.3: β-Lactoglobulin, pH 7,0

Die Streuungen der relevanten Meßgrößen sind bei pH 7,0 auch in Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren deutlich geringer, sofern diese noch nicht gebraucht worden sind. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß einerseits die Proteinadsorption in Kapillaren mit derivatisierter Oberfläche verzögert abläuft, daß andererseits die geringere Polarität das Adsorptionsverhalten von β-Lactoglobulin beeinflusst.

### 5.6.3.3 Untersuchungen bei pH 6,0

Die nächste Meßreihe wird bei pH 6,0 in einem 50 mM Phosphat-Puffer durchgeführt. Die Versuchsbedingungen bleiben mit U=20 kV und p=40 mbar ansonsten unverändert. Zu Beginn wird die Systempräzision bestimmt, wobei sich die Migrationszeiten von internem Standard und EOF-Markern gut reproduziert werden können. Bei den Peakflächen von Acetanilid treten erneut Integrationsprobleme dadurch auf, weshalb die Schwankungen (s. Tab. 5.6.3.3.1) signifikant größer sind als bei Neostigmin (RSD%AU=1,80%, RSD%korr. AU=2,25%).

## 5 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

BR-LAC-060603 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	4,883	4,849	4,917	0,055	1,123	0,00301
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	26,876	24,769	28,982	3,399	12,646	11,55189
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	5,503	5,080	5,926	0,682	12,400	0,46555
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,356	3,323	3,390	0,054	1,616	0,00294
Experiment								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	8,686	8,106	9,265	1,620	18,649	2,62396
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	41,433	39,563	43,303	5,226	12,612	27,30766
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	4,849	4,662	5,037	0,524	10,811	0,27485
EOF	[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	1,326	1,080	1,573	0,688	51,892	0,47364

Tabelle 5.6.3.3.1: Ergebnisse Acetanilid, pH 6,0 (BR-LAC-060603)

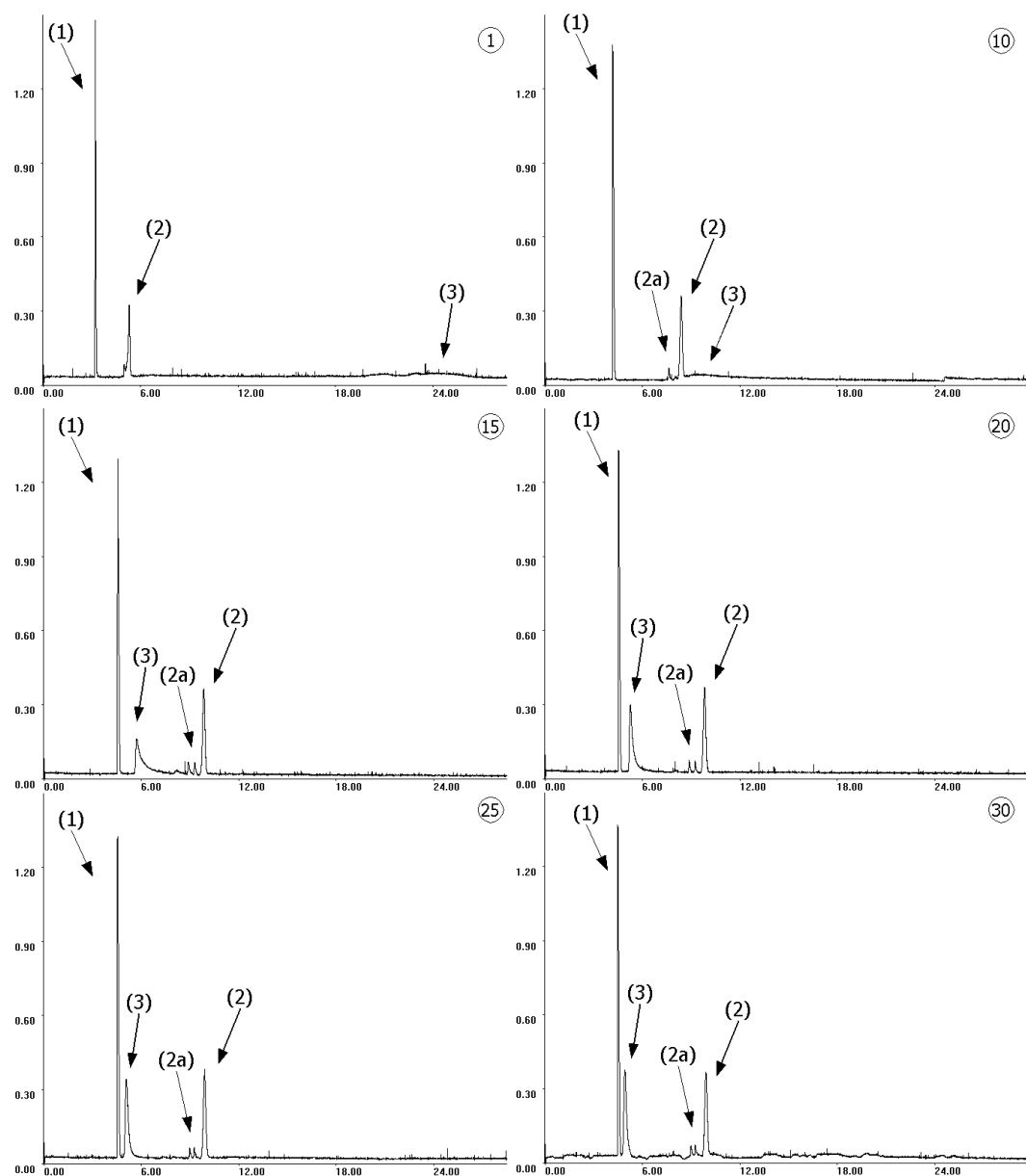


Abbildung 5.69: β-Lactoglobulin (~ 5 ng pro Injektion; BR-LAC-060603)  
Phosphat-Puffer pH 6,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=20 kV, p=40 mbar, I ~ 73 μA; Läufe 1, 10, 15, 20, 25, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) β-Lactoglobulin

Im Verlauf der Messungen mit  $\beta$ -Lactoglobulin tritt eine Reihe von Veränderungen in den Elektropherogrammen auf. Neben einer Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) in den ersten 14 Läufen beobachtet man grundlegende Veränderungen der Proteinpeakform (s. Abb. 5.69). Während  $\beta$ -Lactoglobulin (3) in den ersten 10 Läufen als langgestreckter Peak schlecht zu erkennen ist, verändern sich Peakhöhe und -breite ab dem 12. Lauf. Nach dem 14. Lauf stabilisieren sich die Migrationszeiten von Neostigmin und Acetanilid, während die Migrationsgeschwindigkeit von  $\beta$ -Lactoglobulin noch weiter zunimmt. Damit beobachtet man die gleichen Veränderungen wie in Kapitel 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.6.2.2.

Die gemessenen Schwankungen der Migrationszeiten sind bei dem makromolekularen Analyten mit 8,82% geringer als bei den Vergleichssubstanzen, bei denen die RSD% 10,81 bzw. 18,65% beträgt. Das liegt daran, daß der Proteinpeak in den ersten 10 Läufen von der Integrationssoftware nicht zu erfassen ist und somit nur 20 Werte in die Berechnung eingehen. Die detektierte Proteinmenge nimmt im Verlauf der Meßreihe zu, was daran liegt, daß die Peakform eine bessere Integration ermöglicht. Andererseits lassen sich ab dem 20. Lauf keine Hinweise für eine Adsorption des Proteins finden.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin	5,392	5,183	5,600	0,475	8,816	0,22592
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	40,368	35,203	45,533	11,785	29,194	138,88813
korrr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,697	6,568	8,826	2,576	33,474	6,63794

Tabelle 5.6.3.3.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,0 (BR-LAC-060603)

Die Ergebnisse der Untersuchungen in Kapitel 5.6.2.1 zeigen, daß der IP von  $\beta$ -Lactoglobulin bei etwa 5,3-5,5 liegt. Folglich ist das Protein in den durchgeführten Experimenten bei pH 6,0 negativ geladen. Aus diesem Grund ist die veränderte Migrationsreihenfolge ab dem 11. Lauf bemerkenswert. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt besteht darin, daß das Protein eine grundlegende Konformationsänderung erfährt und sich das Oberflächenpotential dadurch umkehrt. Eine andere Möglichkeit ist, daß sich die Eigenschaften der Kapillaroberfläche durch Proteinadsorbate auf der Polyacrylamid-Beschichtung ändern und dadurch das Migrationsverhalten von Acetanilid beeinflusst wird. Eine der Anforderungen, die an EOF-Marker gemacht werden, ist, daß die elektrisch neutrale Verbindung keine Wechselwirkungen mit der Kapillaroberfläche eingehen darf (vgl. Kap 1.4.5.2). Wenn diese Vorausset-

zung nicht mehr erfüllt ist und Acetanilid gleichzeitig durch chromatographische Verteilungsprozesse stärker zurückgehalten wird als  $\beta$ -Lactoglobulin, kann es zur Veränderung der Migrationsreihenfolge kommen.

#### 5.6.3.4 Untersuchungen bei pH 6,5 – Langzeitmeßreihe

Die Präzision von Migrationszeiten, Peakflächen und korrigierten Flächen soll auch in einer ausgedehnten Meßreihe untersucht werden. Für die Elektrophorese wird ein 50 mM Phosphat-Puffer, pH 6,5, verwendet. Um die Ergebnisse mit den vorausgegangenen Meßreihen vergleichen zu können, wird mit einer Spannung von 20 kV und 40 mbar zusätzlichem Druck gearbeitet. Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen wird die Systempräzision ermittelt. Die Werte von Neostigmin weisen ähnliche Streuungen auf wie die von Acetanilid (vgl. Tab 5.6.3.4.1).

Systempräzision 1 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,495	4,493	4,497	0,061	1,348	0,00367
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	24,294	23,146	25,443	1,361	5,604	1,85325
corr. Fläche	[AU]	Acetanilid	5,405	5,350	5,461	0,300	5,542	0,08974
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,781	3,778	3,784	0,072	1,896	0,00514

Tabelle 5.6.3.4.1: Systempräzision, EOF-Marker pH 6,5 (BR-LAC-110603)

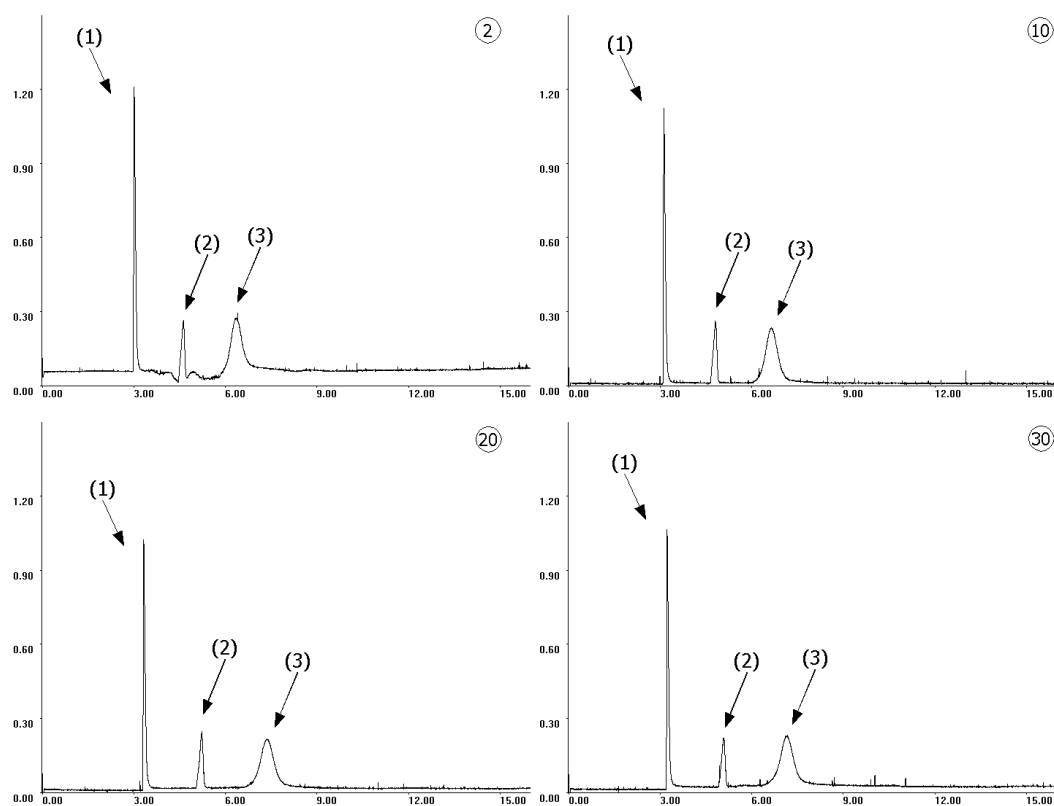


Abbildung 5.70:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; BR-LAC-110603)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 84 \mu\text{A}$ ; Läufe 2, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Im Anschluß werden 99 Wiederholungsversuche durchgeführt, wobei nach dem 69. Lauf eine frisch hergestellte Probe verwendet wird. Im Verlauf der Meßreihe ändert sich Reproduzierbarkeit deutlich. Während sich das Peakmuster in den ersten 33 Läufen kaum verändert und die RSD%-Werte der Migrationszeiten zwischen 3,2% (Neostigmin) und 5,4% ( $\beta$ -Lactoglobulin) liegen, betragen die Schwankungen der korrigierten AU Werte zwischen 6,0% (Neostigmin) und 10,2% (Acetanilid). In Abbildung 5.70 sind einige der Elektropherogramme aus diesem Abschnitt zusammengefaßt. Das Peakmuster ändert sich ab dem 34. Lauf deutlich.

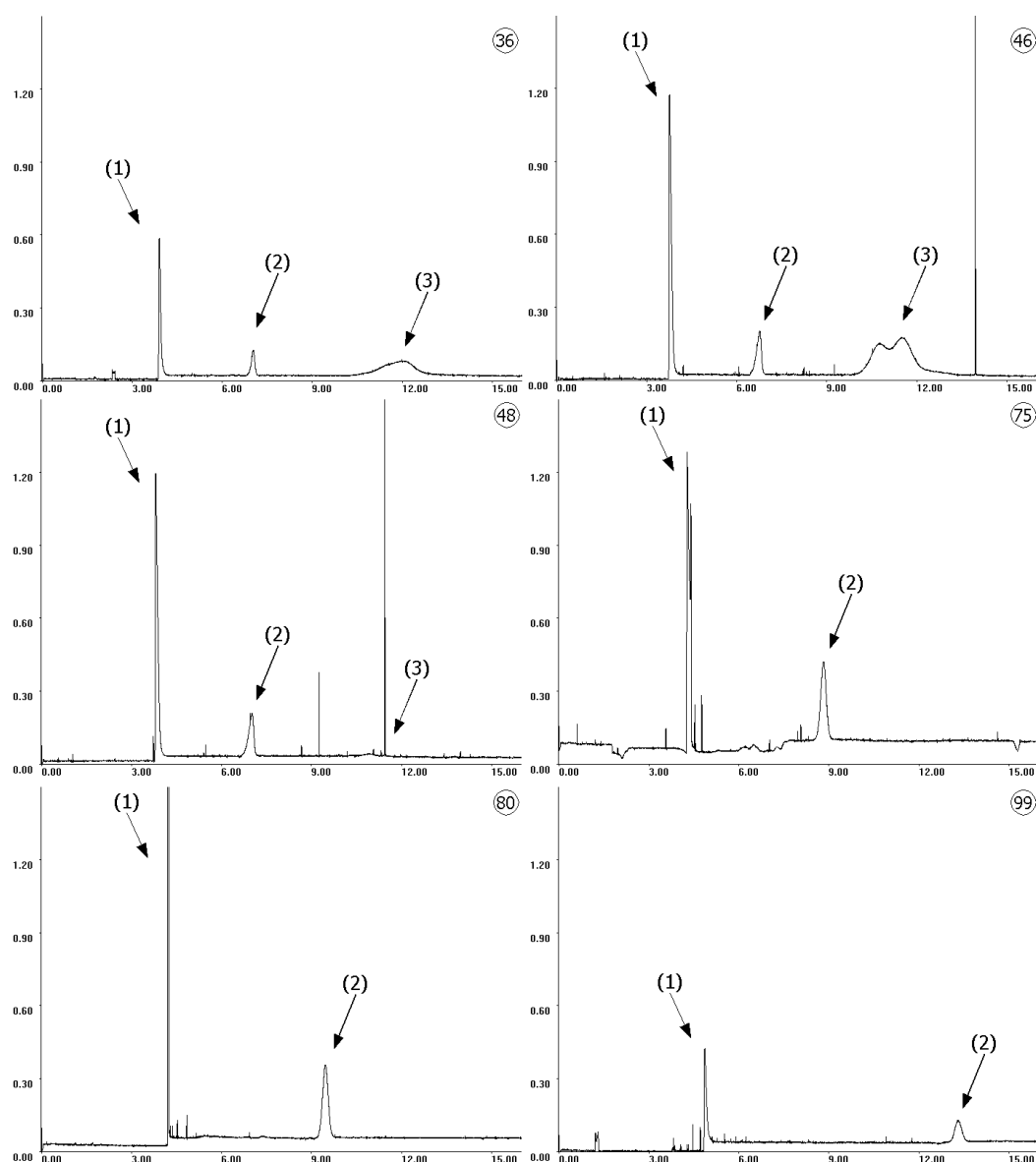


Abbildung 5.71:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 3$  ng pro Injektion; BR-LAC-110603)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 84 \mu\text{A}$ ; Läufe 36,46,48,75,80,99  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Zwischen dem 31. und 69. Lauf schwanken die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) deutlich stärker. Auch die Streuung der korri-

gierten Peakflächen nimmt zu und liegt bei 32% für das Protein bzw. zwischen 17-27% bei den Vergleichssubstanzen.

Die verschiedenen Probleme, die in Elektropherogrammen auftreten, sind in Abb. 5.71 illustriert. Im Gegensatz zu den bisherigen Meßreihen sind auch interner Standard und EOF-Marker von den Veränderungen der Peakform betroffen. In den Läufen 34-36 nehmen die Migrationszeiten von  $\beta$ -Lactoglobulin zu, während gleichzeitig die Peakhöhe von Neostigmin abnimmt. In den anschließenden Läufen beobachtet man das gleiche Peakmuster wie zu Beginn der Untersuchung. Im Zeitraum zwischen dem 40. und 47. Lauf zeigt der Proteinpeak zwei Maxima, so daß man von der Co-Existenz verschiedener Proteinformen, die sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Eigenschaften unterscheiden, ausgehen muß. Ab den 48. Lauf und trotz der Verwendung einer frisch hergestellten Probe (69. Lauf) läßt sich das  $\beta$ -Lactoglobulin nicht mehr detektieren. Die Meßwerte der letzten 30 Läufe zeigen gegenüber den vorausgegangenen Abschnitten nochmals größere Abweichungen. So liegen die RSD%-Werte der korrigierten Peakflächen deutlich über 40%. Stellt man die Ergebnisse der gesamten Meßreihe denen der Kontrollläufe gegenüber, stellt man fest, daß sich die Mittelwerte von  $t_{\text{Mig}}$ , AU und korr. AU bei Neostigmin (vgl. Tab. 5.6.3.4.2) nicht deutlich unterscheiden. Die RSD% liegt im Vergleich zu den Werten der Systempräzision um ein Vielfaches höher.

BR-LAC-110603 Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	3,900	3,800	3,999	0,711	18,224	0,50514
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	70,686	-14,023	155,395	20,737	29,337	430,03047
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	18,474	13,921	23,028	4,808	26,025	23,11573
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	7,694	6,104	9,283	2,826	36,737	7,98859
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	27,941	5,616	50,266	10,592	37,908	112,18562
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	3,963	3,433	4,494	1,633	41,202	2,66677
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,954	1,690	2,218	1,146	58,633	1,31290
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,698	6,904	8,492	1,657	21,529	2,747
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	75,656	3,722	147,589	15,777	20,854	248,92076
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	10,115	8,978	11,252	1,984	19,610	3,93447

Tabelle 5.6.3.4.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 Ergebnisse für n=99

Bei Acetanilid sind die Unterschiede zwischen der Kontroll- und Meßreihe deutlich größer als beim internen Standard. Während bei den Migrationszeiten und absoluten Peakflächen deutlich Zunahmen verzeichnet werden, liegt der Mittelwert für die korrigierten Peakflächen, trotz gleicher Probenkonzentration, um 27% niedriger im Ver-

gleich mit den Kontrollexperimenten. Die extreme Streuung der Meßdaten läßt sich an Grenzen der Vertrauensintervalle besser verdeutlichen als an den RSD%-Werten. Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\alpha=5\%$  liegt der wahre Mittelwert der absoluten Flächen in einem Bereich, dessen Grenzen über  $+80\%$  des Mittelwertes betragen. Die vergleichsweise geringen Abweichungen bei  $\beta$ -Lactoglobulin sind darauf zurückzuführen, daß bei der Berechnung lediglich 46 Werte eingehen und sich die Ergebnisse kaum mit den anderen Analyten vergleichen lassen.

### 5.6.3.5 Integration von Spülschritten

Für die abschließenden Untersuchungen wird eine neue Kapillare verwendet, weil die zuvor benutzte durch intensives Spülen mit Wasser nicht mehr soweit gereinigt werden konnte, daß eine weitere Verwendung möglich ist. Für die Experimente verwendet man einen 50 mM Phosphat-Puffer, pH 6,5. Die Elektrophorese wird bei 20 kV und 40 mbar durchgeführt (s. Kap. 9.4.6). Die Untersuchungen sollen klären, ob sich Proteinadsorbate durch einen zusätzlichen Spülschritt zwischen den Läufen beseitigen lassen. Als Vorlage dient eine etablierte Methode, die in unbeschichteten Kapillaren zu deutlichen Verbesserungen der Präzision führt. Dazu verwendet man eine Pufferlösung, der Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt wird, wobei die Konzentration des Tensids 200 mM beträgt [27][137][138].

Zu Beginn der Versuchsreihe wird die Systempräzision aus 15 Kontrollversuchen bestimmt (s. Tab. 5.6.3.5.1). Die Resultate zeigen, daß sowohl die Migrationszeiten als auch die korrigierten Flächen deutlich streuen. Während die Werte für  $t_{\text{Mig}}$  zunehmen, werden die AU- und korr. AU-Werte kleiner, wobei die RSD% der gebildeten Flächenquotienten um 0,83 bzw. 1,59% streuen.

Systempräzision 1		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	3,086	3,077	3,096	0,138	4,474	0,01907
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	64,518	62,402	66,634	2,045	3,169	4,18138
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	20,969	19,773	22,164	1,537	7,330	2,36211
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	4,755	4,717	4,793	0,275	5,779	0,07550
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	28,661	28,227	29,095	0,926	3,232	0,85784
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	6,056	5,919	6,192	0,519	8,570	0,26931
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,504	3,462	3,545	0,285	8,139	0,08132

Tabelle 5.6.3.5.1:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (BR-LAC-170603)

Im Anschluß werden 10 Versuche durchgeführt, bei denen etwa 14 ng  $\beta$ -Lactoglobulin pro Lauf injiziert werden. Durch die deutliche Erhöhung der Proteinmenge wird die

Proteinadsorption forciert, so daß eine teilweise Belegung der Kapillaroberfläche vor Beginn der Versuchsreihe vorliegt. Die Ergebnisse in Tab. 5.6.3.5.2 belegen, daß bei allen Meßgrößen die Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollläufen zunehmen. Insbesondere die RSD%-Werte für die korr. AU-Werte belegen, daß während dieser 10 Läufe Probleme durch die Adsorption von  $\beta$ -Lactoglobulin verursacht werden.

BR-LAC-170603		Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Neostigmin	3,252	3,245	3,258	0,099	3,033	0,00972
Fläche	[AU·min]	Neostigmin	36,677	30,030	43,325	3,275	8,929	10,72503
korr. Fläche	[AU]	Neostigmin	8,573	7,961	9,184	0,993	11,588	0,98690
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	5,218	5,183	5,253	0,239	4,573	0,05694
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	5,218	5,183	5,253	0,239	4,573	0,05694
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	1,185	1,131	1,239	0,296	24,944	0,08739
EOF	[ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,049	3,021	3,076	0,211	6,927	0,04460
$t_{\text{Mig}}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,172	6,869	7,474	0,488	6,802	0,23798
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	171,229	164,119	178,340	11,472	6,700	131,61168
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	24,061	22,128	25,994	3,119	12,965	9,73056

Tabelle 5.6.3.5.2:  $\beta$ -Lactoglobulin, pH 6,5 (BR-LAC-170603)

Sowohl die normierten Flächenwerte als auch die gebildeten Flächenquotienten zeigen ausgeprägte Schwankungen, die unabhängig von Injektionsfehlern sind. Zweck dieser Vorgehensweise ist, daß die Unterschiede zwischen den Meßreihen bei pH 6,5 (PM-LAC-191103, PM-LAC-041203, BR-LAC-210503) einerseits und den Experimenten mit integriertem Spülschritt andererseits deutlicher werden. Wenn es gelingt durch den Spülschritt mit einer Tensid-haltigen Lösung die Adsorbate zu entfernen, sollten sich die Meßwerte denen der Systempräzision annähern.

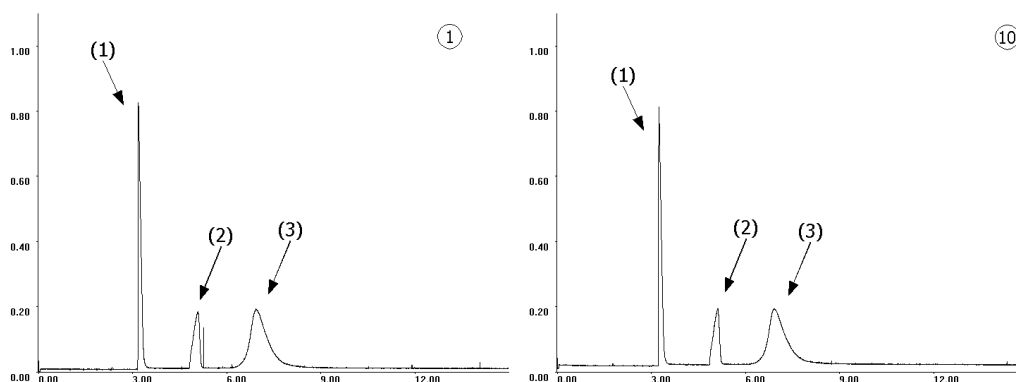


Abbildung 5.72:  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\sim 14$  ng pro Injektion; BR-LAC-170603)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20 \text{ kV}$ ,  $p=40 \text{ mbar}$ ,  $I \sim 83 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

Die in Abbildung 5.72 gezeigten Elektropherogramme weisen ein reproduzierbares Peakmuster auf, bei dem die Migrationsreihenfolge von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) mit dem prognostizierten Verhalten übereinstimmt.



Bei den anschließenden Versuchen wird das Injektionsvolumen um 60% reduziert und dadurch die Proteinmenge auf etwa 5,5 ng reduziert. Dies entspricht etwa dem Doppelten des sonst analysierten  $\beta$ -Lactoglobulins. Vor jedem Lauf wird die Kapillare jeweils 4 min mit SDS-haltiger Lösung und anschließend mit Puffer gespült. Der Druck beträgt während beider Schritte 1000 mbar, so daß das Kapillarvolumen jeweils etwa sechsmal ausgetauscht wird, bevor die Probe hydrodynamisch injiziert wird. Die Substanztrennung erfolgt bei 20 kV und 40 mbar Druck.

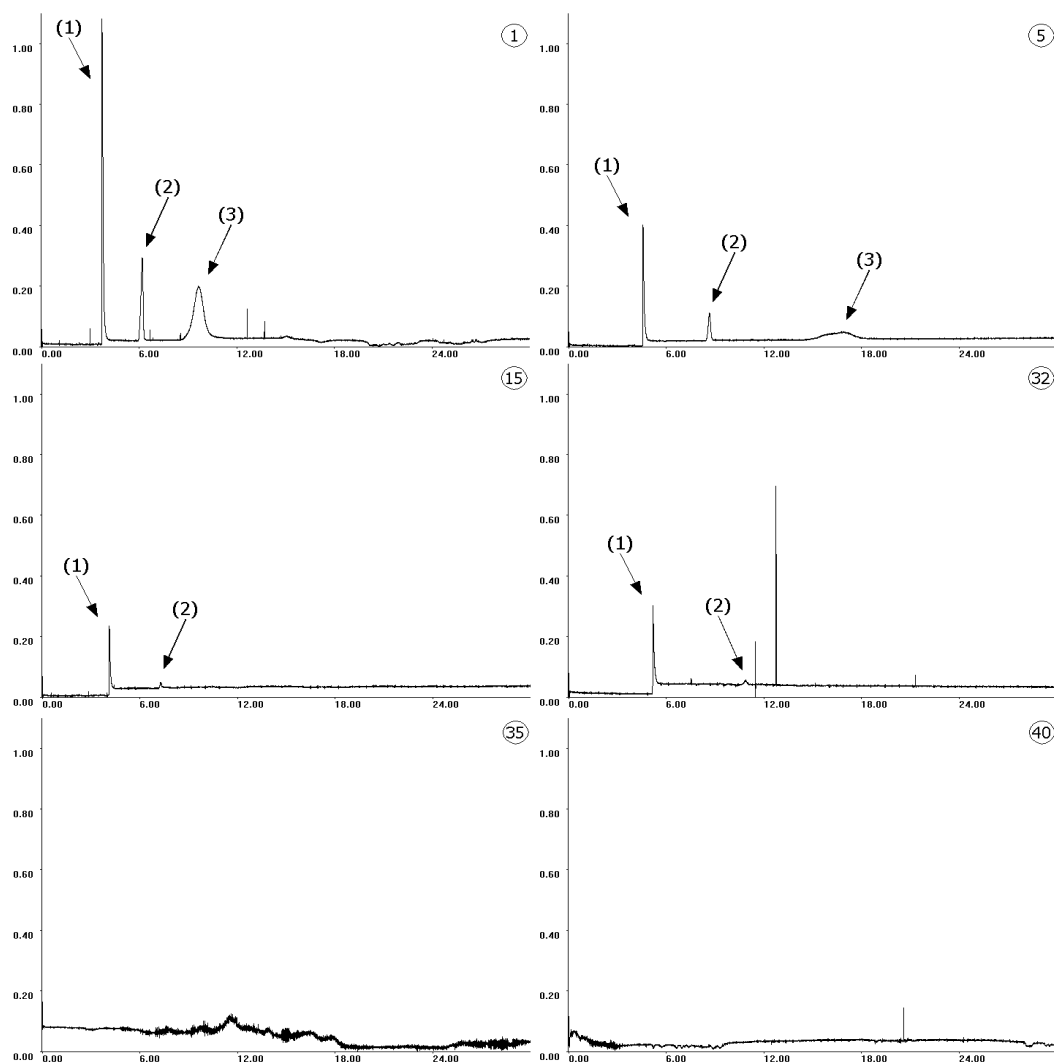


Abbildung 5.73: SDS ( $\sim 132$  ng pro Injektion; BLG 5,5 ng je Lauf; BR-LAC-170603)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=20$  kV,  $p=40$  mbar,  $I \sim 83 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 15, 32, 35, 40  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3)  $\beta$ -Lactoglobulin

In Abb. 5.73 sind einige der Elektropherogramme dargestellt, die während der 40 Läufe umfassenden Meßreihe aufgenommen worden sind. Es ist deutlich zu erkennen, daß das Peakmuster innerhalb von wenigen Läufen nicht mehr im geringsten reproduziert werden kann. Die Geschwindigkeit, mit welcher die Präzision abnimmt, übertrifft selbst die Meßreihe BR-LAC-110603, bei der bereits über 230 Messungen

unter kritischen Bedingungen in der gleichen Kapillare durchgeführt worden sind. In den ersten 10 Läufen lassen sich die Peaks von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und  $\beta$ -Lactoglobulin (3) noch zuordnen. Neben einer deutlichen Zunahme der Migrationszeiten fällt auf, daß der Proteinpeak unverhältnismäßig flach wird und ab etwa dem 12. Lauf nicht mehr von den Schwankungen der Basislinie zu unterscheiden ist. Gleichzeitig nehmen die Peakhöhen und -flächen der Vergleichssubstanzen so stark ab, daß eine verlässliche Quantifizierung nicht mehr möglich ist. Im Fall von Acetanilid liegt das Signal-Rausch-Verhältnis bei etwa 2:1 bis 3:1. Basislinienschwankungen verhindern aber, daß der Peak als solcher von der Integrationssoftware erkannt wird. Ab dem 33. Lauf lassen sich keine Substanzpeaks in den Elektropherogrammen mehr beobachten, während das Rauschen nur in vereinzelten Läufen zunimmt.

Aufgrund von Integrationsproblemen lassen sich kaum gesicherte Meßdaten erheben, die ausgewertet werden können. Wesentlich wichtiger ist die Beobachtung, daß durch den Einsatz der SDS-haltigen Lösung die Robustheit der Methode vollständig verloren geht. Die Tatsache, daß sich  $\beta$ -Lactoglobulin bereits nach 12 Läufen nicht mehr detektieren läßt, läßt auf Probleme im Zusammenhang mit dem verwendeten Tensid schließen. In separaten Versuchen mit neuen Kapillaren, bei denen kein Protein injiziert wird, zeigt sich, daß selbst die Reproduzierbarkeit eines Substanzgemisches aus Neostigmin und Acetanilid durch den Einsatz von SDS massiv gestört wird. Anscheinend liegt eine Inkompatibilität zwischen Polyacrylamid und dem Tensid vor, da schon wenige Minuten beim Spülen mit der SDS-Lösung reichen, um Elektropherogramme wie in Abb. 5.73 (Läufe 34 und 40) zu erhalten. Eine Erklärung für die in Reihe BR-LAC-170603 beobachteten Veränderungen beruht auf der Annahme, daß der Alkylrest des Tensids in die Polymerschicht eingelagert wird. Neben der Ausbildung eines Oberflächenpotentials kann auch angenommen werden, daß das Beschichtungsmaterial ab einer bestimmten Menge absorbierten Tensids aufquillt. Man weiß aus der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page), daß Proteine in Gegenwart von Tensiden denaturieren, indem die Alkylketten in den hydrophoben Kernbereich des Makromoleküls eindringen und zur Bildung von zufälligen Tertiärstrukturen führen. Unterstellt man im Fall der durchgeführten Untersuchung, daß das Tensid im zweiten Spülschritt nicht vollständig ausgewaschen wird, können sich nach der Proteininjektion entsprechend negativ geladenen SDS-Proteinassoziate bilden. Durch

die variable Struktur und den damit unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten liegen mikroheterogene  $\beta$ -Lactoglobulin-Fractionen vor, die anodisch gerichtet gegen den EOF wandern und die beobachteten Peakverbreiterungen verursachen.

### 5.6.3.6 Diskussion der Teilergebnisse

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Meßreihen ist zunächst hervorzuheben, daß die gewonnenen Meßdaten deutlich größere Schwankungen aufweisen, wenn die Kapillare für mehrere Meßreihen verwendet wird.

Bei den Untersuchungen der Tagespräzision in Kap. 5.6.2 können relative Standardabweichungen für die korr. AU-Werte meist im Bereich von 8-10% erreicht werden, sofern die Stabilität der Proteinstruktur nicht verloren geht. Im Gegensatz dazu liegt die Präzision der korrigierten Peakflächen von  $\beta$ -Lactoglobulin meist um 30% RSD%. Die Streuung der Meßwerte ist für das Protein auch hier deutlich größer als für den verwendeten internen Standard oder den EOF-Marker. Stellt man die Meßwerte von Neostigmin graphisch dar (s. Abb. 5.74), lassen sich bereits einige grundsätzliche Feststellungen treffen. Bei den Migrationszeiten von Neostigmin ist hervorzuheben, daß die Werte bei den meisten Kontrollserien geringeren Schwankungen unterliegen als bei den anschließenden Proteinuntersuchungen.

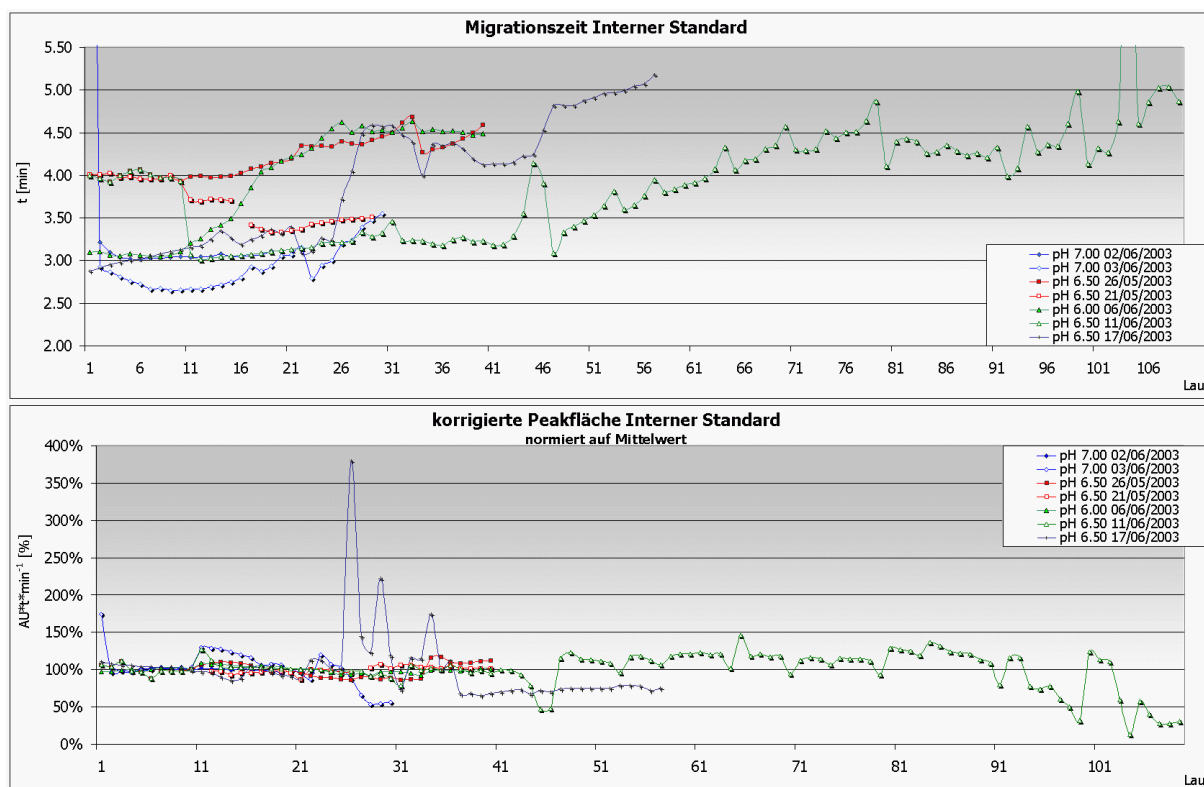


Abbildung 5.74: Ergebnisse Neostigmin in den Langzeituntersuchungen ( $t_{\text{Mig}}$  und korr. AU)

Mit Ausnahme der letzten Meßreihe BR-LAC-110603, die als letzte in der Kapillare durchgeführt wurde, liegen die Migrationszeiten zu Beginn bei etwa 3 min, unabhängig von den vorausgegangenen Untersuchungen. Ebenso muß hervorgehoben werden, daß die Migrationszeiten nicht durchgängig große Schwankungen aufweisen. Vielmehr gibt es Phasen in einer Meßreihe, in denen die Meßwerte merklich weniger schwanken als in anderen. Dieses Phänomen ist auch schon bei den Versuchen in Kap. 5.6.2 zu erkennen und läßt sich darauf zurückführen, daß sowohl die hydrodynamische als auch elektrophoretische Komponente der Migrationsgeschwindigkeit voneinander unabhängig schwanken. Auch bei den korrigierten Peakflächen wechseln sich Phasen mit relativ konstanten Werten mit solchen Bereichen ab, die große Abweichungen zeigen. Daher kann es für die Auswertung und Interpretation von Meßergebnissen hilfreich sein, die korr. AU-Werte der Analyte als (theoretisch) zeitunabhängige Größen zueinander ins Verhältnis zu setzen und um damit Veränderungen in der Probenzusammensetzung erkennen zu können. Bei den durchgeführten Langzeituntersuchungen ist diese Verfahrensweise nur bedingt anwendbar, weil auch die Meßwerte des internen Standards als Bezugsgröße selbst zu sehr streuen.

Analysiert man die Meßwerte von  $\beta$ -Lactoglobulin stellt man einige interessante Zusammenhänge fest. Bei den in Abb. 5.75 dargestellten Migrationszeiten und den auf den jeweiligen Mittelwert normierten korrigierten Peakflächen fällt auf, daß in beiden Graphen die größten Schwankungen in der ersten und der letzten Meßreihe auftreten. Bei der ersten Meßreihe (pH 6,5 No1) beobachtet man im Verlauf der Untersuchungen eine Zunahme der Migrationszeiten, während die korr. AU-Werte deutlich abnehmen. Folglich scheint die Proteinadsorption zeitlich verzögert einzusetzen, verglichen mit Versuchen in unbeschichteten Kapillaren. Im Gegensatz dazu nehmen Migrationsgeschwindigkeit und korrigierte Flächen bei pH 6,0 im Verlauf der Messungen zu. Dieses Verhalten läßt sich dadurch erklären, daß zunächst strukturelle Veränderungen beim  $\beta$ -Lactoglobulin auftreten, die zur Adsorption an der Beschichtung führen. Erst bei späteren Läufen hat sich ein dynamisches Gleichgewicht eingestellt, so daß die korr. AU-Werte zunehmen. Die Ergebnisse zeigen, daß auch in beschichteten Kapillaren Adsorptionsprobleme auftreten und diese proteinimmanent sind. Daher muß davon ausgegangen werden, daß allgemein Wechselwirkungen von Proteinen auch mit wenig polaren Oberflächen möglich sind und sich negativ auf die Robustheit

und Präzision einer zonenelektrophoretischen Methode auswirken. Außerdem zeigen die Versuche, daß für die Reinigung von beschichteten Kapillaren andere Methoden und Reagenzien nötig sind als bei solchen mit nativer Kieselglasoberfläche.

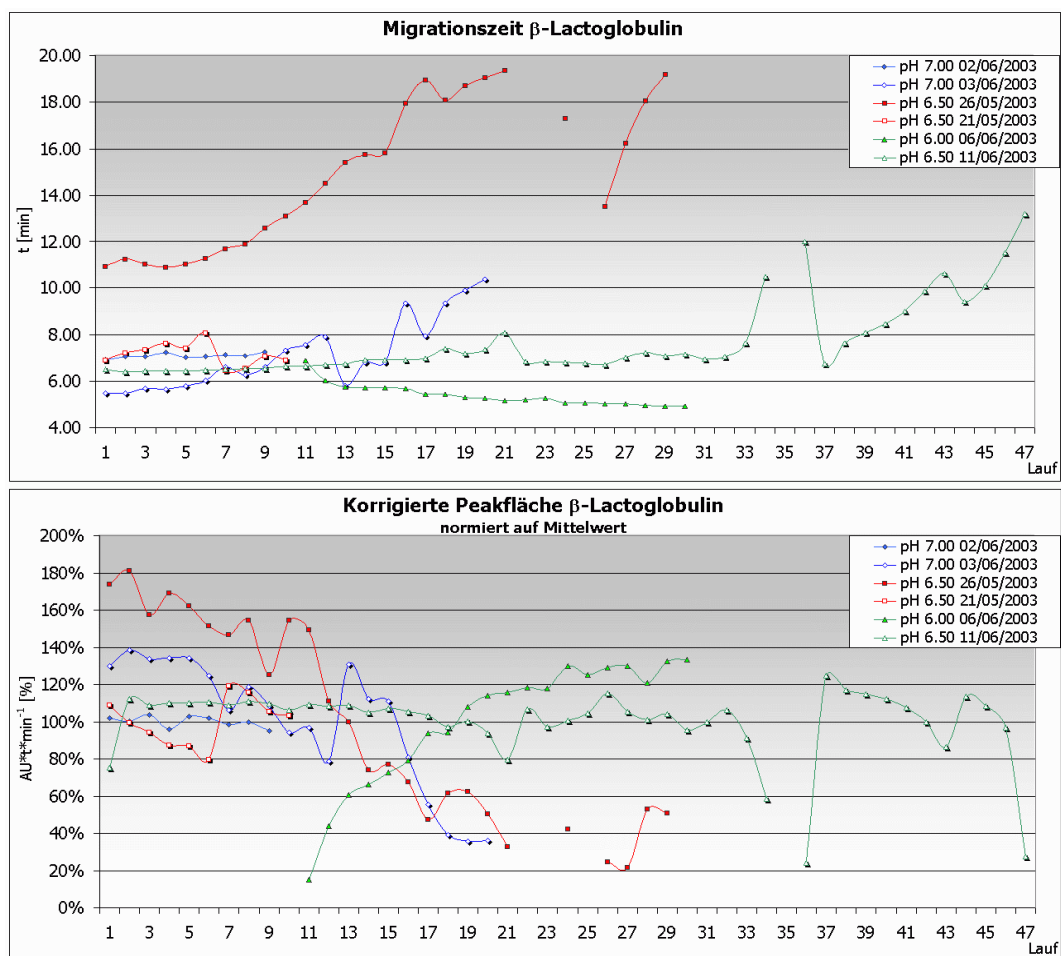


Abbildung 5.75: Ergebnisse  $\beta$ -Lactoglobulin LPA-beschichtete Kapillaren

## **5.7 Myoglobin – ein kleines, neutrales Protein**

Das untersuchte Myoglobin stammt aus dem Myokard des Pferdes (*Equus caballus*) und gehört zur Gruppe der globulären Proteine mit Protoporphyrin IX Ringsystem als prosthetischer Gruppe. Als cytosolisches, monomer vorliegendes Protein ist es in der Muskelzelle am Sauerstofftransport beteiligt, wobei NADH als Cofaktor benötigt wird. Im Unterschied zu Cytochrom C ist das Protoporphyrin-Ringgerüst nicht kovalent gebunden. Die Bildung von met-Myoglobin durch Oxidation des Eisen(II)atoms im Protoporphyrin IX Systemen ist ein reversibler Prozeß, der auch unter physiologischen Bedingungen beobachtet wird. Die Molmasse beträgt 16,95 kDa für die 153 Aminosäuren umfassende Primärstruktur (<http://us.expasy.org/uniprot/P68082>). Der abgeleitete, theoretische IP beträgt 7,39. Allerdings werden in der Literatur Werte von 7,3 [4], 7,0 [123] und 6,9 [124] angegeben. In der Primärstruktur von Myoglobin kommen keine Cystein- oder Cystin-Funktionen vor, so daß sich keine Di- oder Oligomere über Disulfid-Brücken bilden können. Zu möglichen post-translationalen Modifikationen und Isoformen mit anderem IP liegen keine Angaben vor.

### **5.7.1 Standardmethode**

Das elektrophoretische Verhalten von Myoglobin soll in einer Serie von Meßreihen untersucht werden. Im Gegensatz zu den anderen Modellproteinen sind keine kritischen Eigenschaften bekannt, wie der hohe IP von Cytochrom C, die kooperative, tetramere Struktur von boviner Catalase oder die Strukturveränderungen von  $\beta$ -Lactoglobulin in bestimmten pH-Bereichen. Daher besteht keine Notwendigkeit bei den Versuchsreihen von den Standardbedingungen abzuweichen (vgl. Kap. 7 und 9.8). Mögliche Einflüsse der Sterilfiltration, der Ionenstärke des Puffers oder die Desorption von Proteinplaques mit Tensiden sind weiterführende Aufgabenstellungen, die jedoch voraussetzen, daß die Eigenschaften von Myoglobin in der CZE bekannt sind.

#### **5.7.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0**

Bei den Experimenten bei pH 5,0 wird ein 50 mM Acetat-Puffer verwendet, so daß Myoglobin unter diesen Bedingungen als Kation vorliegt. Bedingt durch die negativ geladene Kapillaroberfläche ist mit ausgeprägten Adsorptionsproblemen zu rechnen. Es ist jedoch zu klären, ob sich die Ergebnisse von Towns und Regnier [4] verifizie-

ren lassen, die eine Wiederfindungsrate von 80% bei pH 5,0 angeben, oder sich die Resultate von Cytochrom C unter vergleichbaren Voraussetzungen bestätigen (vgl. Kap. 5.3.1). Zunächst wird Systemstabilität in 30 Wiederholexperimenten untersucht. Die Ergebnisse der Systempräzision sind in Tab. 5.7.1.1.1 für Acetanilid zusammengefaßt. Die RSD%-Werte des als internen Standard verwendeten Melamins sind etwa gleich groß, lediglich die Schwankungen der absoluten Peakflächen sind etwas niedriger mit 1,48% RSD%.

MYOG-110205	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,536	4,489	4,584	0,132	2,914	0,01747
Fläche [AU·min]	Acetanilid	58,058	57,425	58,692	1,770	3,048	3,13120
kor. Fläche [AU]	Acetanilid	12,812	12,600	13,024	0,592	4,623	0,35088
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,236	4,193	4,279	0,121	2,850	0,01457
Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	8,589	5,669	11,509	3,650	42,493	13,32024
Fläche [AU·min]	Acetanilid	93,767	66,229	121,305	34,416	36,704	1184,45577
kor. Fläche [AU]	Acetanilid	11,151	10,420	11,881	0,913	8,183	0,83267
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	2,549	1,804	3,294	0,931	36,516	0,86655

Tabelle 5.7.1.1.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 5,0 EOF-Marker

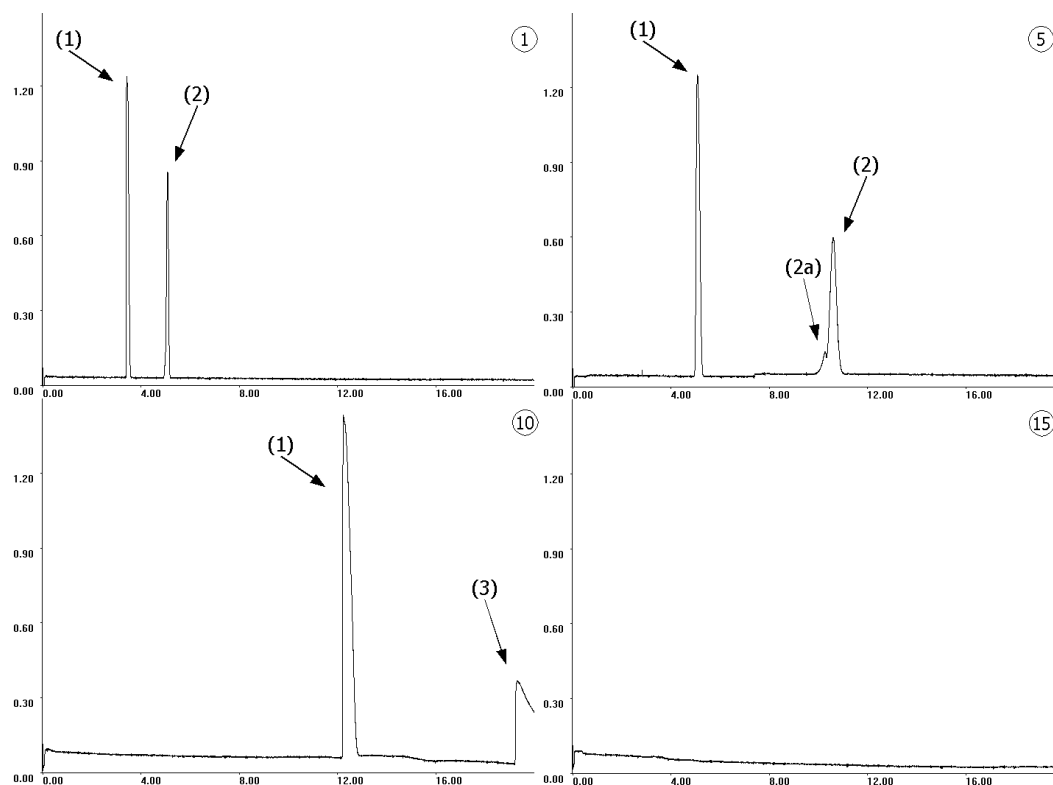


Abbildung 5.76: Myoglobin ( $\sim 5$  ng pro Injektion; MYOG-110205)  
 Acetat-Puffer pH 5,0  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15  
 (1) Melamin und (2) Acetanilid

Bei der anschließenden Untersuchung von Myoglobin beobachtet man eine rapide Zunahme der Migrationszeiten. Innerhalb von nur sechs Läufen gerät der EOF-Mar-

ker (2) aus dem Beobachtungszeitraum von 20 min. Daher berücksichtigen die Werte in Tab. 5.7.1.1.1 nur einen kleinen Stichprobenraum und sind nicht repräsentativ für die gesamte Meßreihe. Sie machen aber deutlich, in welchen Dimensionen sich die Schwankungen der Meßwerte bewegen. In Abb. 5.76 sind lediglich die Elektropherogramme 1, 5, 10 und 15 abgebildet, da ab dem 14. Lauf keine Peaks mehr beobachtet werden können. Im fünften Lauf erkennt man die Verunreinigung (2a) von Acetanilid als eine Schulter auf der linken Peakseite. In den Läufen 8-10 erkennt man weiterhin ein Signal für Myoglobin (3), das aber durch ein ausgeprägtes Tailing charakterisiert ist. Im 13. Elektropherogramm wird der Melamin-Peak (1) zum letzten Mal in der Untersuchungsreihe detektiert.

Bei den abschließenden Kontrollversuchen läßt sich der interne Standard ab dem 23. Lauf wieder erkennen, während die anderen Analyten außerhalb des Zeitfensters bleiben. Die Auswertung der Meßreihe läßt sich lediglich anhand der Ergebnisse aus den Kontrollversuchen und den Daten von Melamin während der Versuchsreihe durchführen. Aus dem Migrationszeiten von internem Standard und EOF-Marker läßt sich  $\mu_{\text{eff}}(\text{Melamin})$  mit  $1,79 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  berechnen. Nimmt man diesen Wert als konstant an, läßt sich die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  trotz fehlender Werte von Acetanilid näherungsweise berechnen (vgl. Kap. 1.4). Man kommt zu dem Ergebnis, daß um den 10. Lauf sich die Richtung des EOF umkehrt. Das liefert auch eine Erklärung, warum sich Acetanilid nicht mehr detektieren läßt und der Proteinpeak lediglich in den Läufen 8-10 auftaucht. Während der ersten Läufe kommt es zu einer ausgeprägten Proteinadsorption, die in den folgenden Läufen nachläßt, so daß das Protein detektiert werden kann. Durch die gleichzeitigen Veränderungen des EOF nimmt die scheinbare Mobilität von Myoglobin soweit ab, daß es während der Meßzeit von 20 min nicht mehr den Detektor passiert. Die Beobachtung, daß der interne Standard am Ende der abschließenden Kontrollreihe wieder detektiert wird, impliziert, daß die elektroosmotische Mobilität zugenommen hat. Die Gründe dafür sind vermutlich darin zu sehen, daß einerseits ein Teil der Proteinplaques ausgewaschen wird und zur teilweisen Rekonstitution der nativen Oberfläche führt. Andererseits unterliegen die adsorbierten Myoglobin-Moleküle Alterungsprozessen, in deren Verlauf es u.a. zu Deamidierungen (vgl. Kap. 2) kommt und sich damit das Oberflächenpotential der Adsorbate in den negativen Bereich verschiebt.



### 5.7.1.2 Untersuchungen bei pH 5,5

In der nächsten Versuchsreihe wird Myoglobin bei pH 5,5 untersucht, wobei als Hintergrundelektrolyt ein 50 mM Acetat-Puffer verwendet wird. Mit diesen Untersuchungen soll geklärt werden, ob sich die Ergebnisse aus Kap. 5.7.1.1 bestätigen lassen und ob die  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte einen ähnlichen Abfall in Gegenwart von Myoglobin zeigen. Ein Teil der Ergebnisse des System-Tests sind in Tab. 5.7.1.2.1 angegeben (vgl. Kap. 9.8.2), wobei die Werte bei Neostigmin bis auf  $t_{\text{Mig}}$  (0,41% RSD%) ähnlich streuen.

MYOG-180205			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	4,521	4,498	4,543	0,063	1,384	0,00391
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	61,410	60,487	62,334	2,536	4,130	6,43310
korrr. Fläche	[AU]		Acetanilid	13,587	13,370	13,805	0,597	4,395	0,35653
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	4,248	4,227	4,269	0,059	1,379	0,00343
Experiment									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	10,706	5,753	15,659	6,686	62,449	44,70152
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	147,580	77,981	217,178	93,951	63,661	8826,82673
korrr. Fläche	[AU]		Acetanilid	13,718	13,420	14,016	0,403	2,934	0,16203
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	2,328	1,513	3,144	1,101	47,281	1,21191

Tabelle 5.7.1.2.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 5,5 EOF-Marker

Bei den Versuchen mit Myoglobin zeigt sich ähnliches Bild wie auch bei pH 5,0, zumal die Migrationszeiten des EOF-Markers nahezu identisch sind mit den Einzelwerten aus MYO-110205. Anstelle von Melamin wird Neostigmin als interner Standard verwendet, da dessen Nettomobilität höher ist. Damit soll verhindert werden, daß Elektropherogramme ohne Peaks aufgenommen werden. Man beobachtet in den Elektropherogrammen (s. Abb. 5.77) das Auftreten der Begleitsubstanz (2a), die aus dem verwendeten Acetanilid (2) stammt. Allerdings läßt sich der EOF-Marker erneut nur bis zum siebten Lauf erfassen (vgl. Meßreihe bei pH 5,0), da die elektroosmotische Mobilität weiter abnimmt. Die Migrationsgeschwindigkeit von Neostigmin (1) nimmt ebenfalls ab, stabilisiert sich aber im Vergleich zu Acetanilid ab dem neunten Lauf.

Der wichtigste Unterschied zur vorausgegangenen Meßreihe besteht darin, daß der Myoglobin-Peak (3) insgesamt kürzere Migrationszeiten aufweist als bei pH 5,0. Dies steht im Widerspruch mit den theoretischen Grundlagen der Kapillarzonenelektrophorese. Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  nimmt mit steigendem pH-Wert zu, aus den Kontrollexperimenten bei pH 5,0 und 5,5 wird aber deutlich, daß der theoretisch größere EOF bei pH 5,5 durch die höhere Ionenstärke fast vollständig kompensiert wird. Gleichzeitig nimmt die effektive Ladung des Proteins durch die Annäherung an

den IP ab, so daß die kathodisch gerichtete Migrationsgeschwindigkeit abnimmt (s. Gl. 11, Kap. 1.4.3). Folglich müßte Myoglobin bei pH 5,5 größere Migrationszeiten aufweisen. Die Meßwerte zeigen aber, daß das Gegenteil der Fall ist.

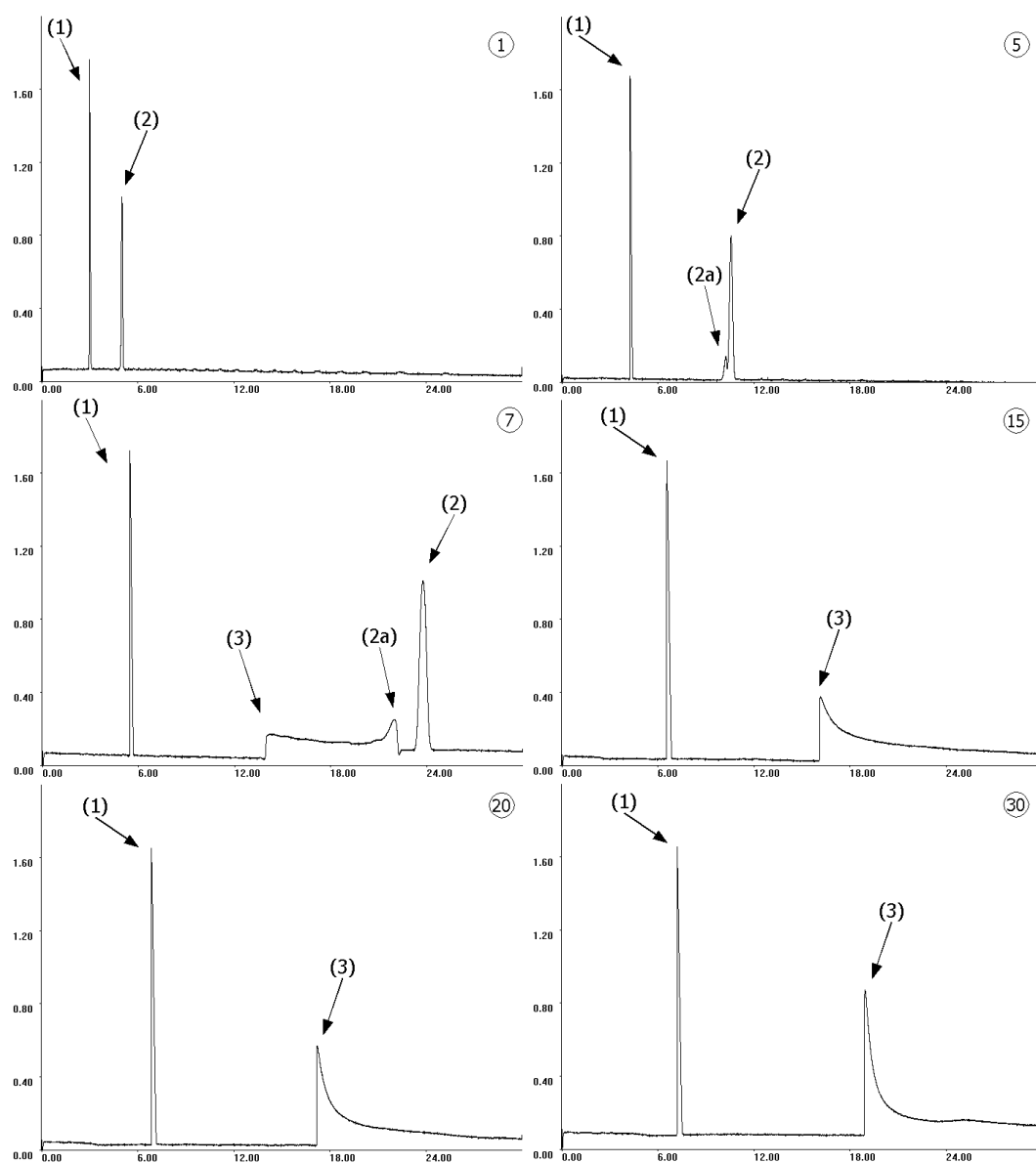


Abbildung 5.77: Myoglobin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; MYOG-180205)  
 Acetat-Puffer pH 5,5  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 7, 15, 20, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Dieser Umstand muß so gedeutet werden, daß Myoglobin sowohl bei pH 5,0 als auch pH 5,5 an der Kieselglasoberfläche adsorbiert. Das deutliche Tailing des Proteinpeaks zeigt, daß neben Adsorptionsvorgängen vermutlich auch unterschiedliche Konformere des Myoglobins vorliegen, welche zu der Verbreiterung des Peaks beitragen. Die Auswirkungen sind bei pH 5,5 aber deutlich geringer, weil die pH-abhängige Gleichgewichtsverschiebung der parallel ablaufenden chromatographischen Prozesse zur Verkürzung der Retentionszeiten führt. Darüber hinaus fällt in den Elektropherogrammen

auf, daß die Flächen- und Höhenwerte des Myoglobin-Peaks zunehmen. Diese Tendenz bestätigt die These, daß die Adsorptionsprozesse zeitlich nicht konstant sind, sondern sich mit zunehmender Anzahl von Messungen immer weniger auswirken.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	16,683	16,097	17,269	1,496	8,967	2,23794
Fläche [AU·min]	Myoglobin	317,120	275,669	358,571	105,745	33,345	11181,981
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	18,601	16,655	20,548	4,966	26,698	24,66193

Tabelle 5.7.1.2.2: Myoglobin, pH 5,5 (MYOG-180205)

Das in Abb. 5.77 (Lauf 7) gezeigte Elektropherogramm ist deshalb hervorzuheben, da bei einem pH-Wert unterhalb des IP des untersuchten Proteins die beobachtete Migrationsreihenfolge mit der theoretischen, prognostizierten übereinstimmt und alle Analyten innerhalb eines akzeptablen Zeitrahmens detektiert werden. Bei dem Peak 2a um die Verunreinigung von Acetanilid, die mit einer Fraktion von Myoglobin komigriert. Bei den abschließenden Kontrollversuchen nehmen die Migrationszeiten von Neostigmin geringfügig ab (RSD%=2,79%). Sie liegen aber durchschnittlich 4 min über den Werten, die bei der Bestimmung der Systempräzision ermittelt wurden.

### 5.7.1.3 Untersuchungen bei pH 6,0

Die Untersuchungen bei pH 6,0 werden in einem 50 mM Phosphat-Puffer durchgeführt, wobei die Spannung 25 kV beträgt (vgl. Kap. 9.8.3). Unter diesen Bedingungen soll geklärt werden, ob sich der Trend von kürzer werdenden Migrationszeiten bei Myoglobin fortsetzt und dadurch die Ergebnisse der beiden vorherigen Meßreihen indirekt bestätigt. Bei der Bestimmung der Systempräzision fällt auf, daß die sonst häufig bei anderen Serien beobachtete Hysteresis des EOF nicht auftritt.

MYOG-041004	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,680	3,665	3,696	0,043	1,176	0,00187
Fläche [AU·min]	Acetanilid	29,270	29,113	29,427	0,438	1,497	0,19195
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,954	7,911	7,996	0,120	1,503	0,01429
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,218	5,196	5,239	0,061	1,161	0,00367
Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	7,260	5,436	9,083	4,461	61,451	19,90146
Fläche [AU·min]	Acetanilid	52,692	35,213	70,171	42,769	81,168	1829,1634
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	6,753	6,201	7,305	1,350	19,997	1,82361
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,281	2,799	3,763	1,179	35,928	1,38949

Tabelle 5.7.1.3.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 6,0 EOF-Marker

Folglich liegen die Abweichungen der relevanten Meßgrößen bei Acetanilid als auch Neostigmin bei 1,5% RSD% (vgl. Tab. 5.7.1.3.1). Bei den Peakflächen bzw. korrigier-

ten Peakflächen sind die Streuungen teilweise auf das Injektionssystem zurückzuführen, da die RSD%-Werte der zueinander in Relation gesetzten Größen unter 0,95% liegen. Die Versuchsreihe mit Myoglobin zeigt einige Besonderheiten, die anhand der in Abb. 5.78 gezeigten Elektropherogramme illustriert werden.

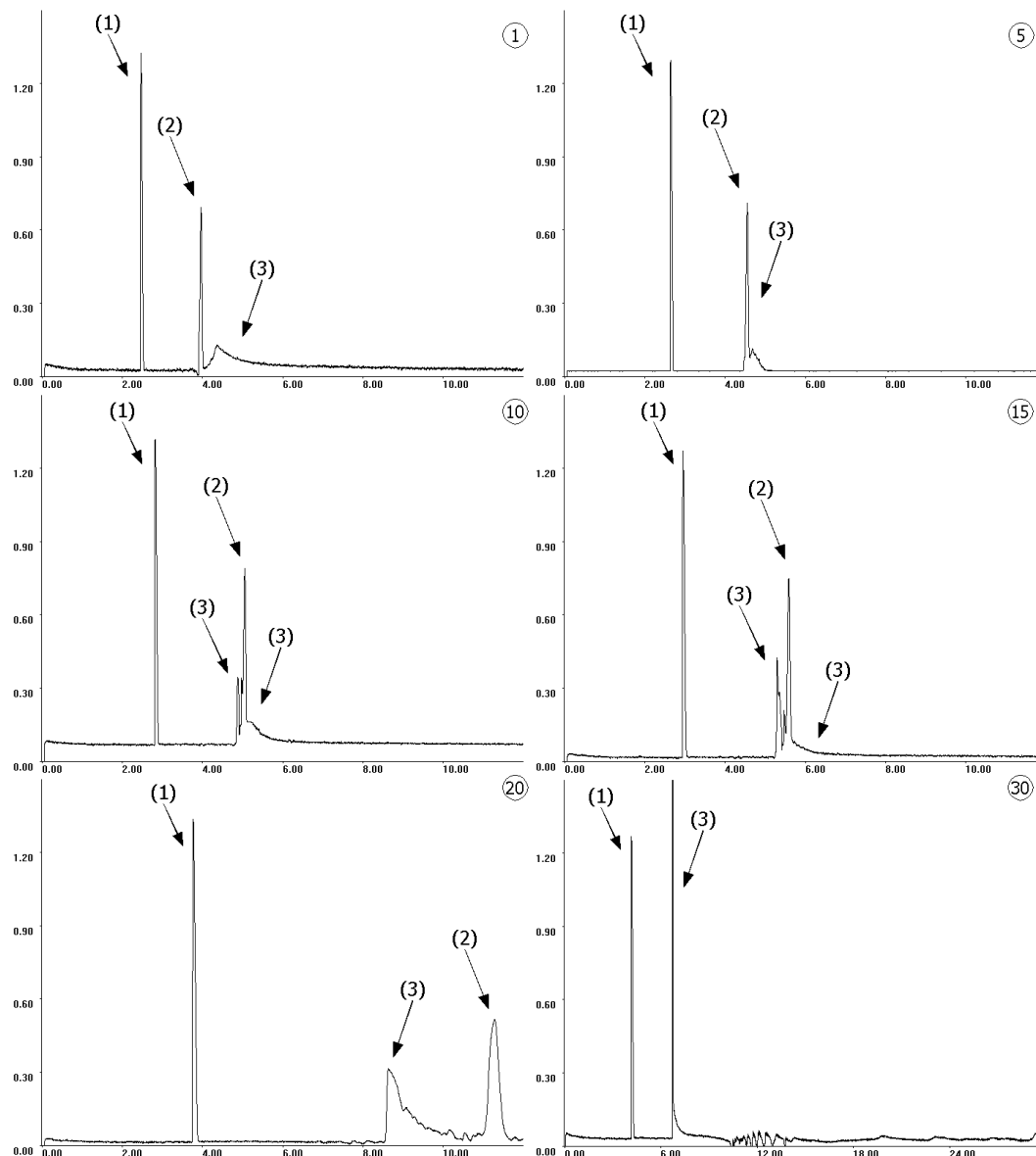


Abbildung 5.78: Myoglobin ( $\sim 5$  ng pro Injektion; MYOG-041004)  
Phosphat-Puffer pH 6,0  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Im weiteren Verlauf der Messungen nimmt die Peakbreite des Proteins genauso wie die Migrationszeit ab, so daß Myoglobin in den Läufen 7 und 8 mit dem EOF-Marker komigriert und einen gemeinsamen Peak liefert. In den nachfolgenden Elektropherogrammen überschneiden sich beide Substanzen, allerdings passiert die Hauptfraktion des Myoglobins das Detektionsfenster vor Acetanilid. Die Zuordnung der Substanzen erfolgt anhand von zwei Kriterien. Zum einen wird das Verhalten der Migrationszeiten

in Relation zum internen Standard Neostigmin (1) beurteilt, zum anderen lassen sich Substanzen auch durch die korr. AU-Werte identifizieren, wenn diese unterschiedlich genug sind. Basierend auf den Werten der Kontrollserie läßt sich die effektive elektrophoretische Mobilität von Neostigmin berechnen. Unter der Annahme, daß diese Größe konstant ist, läßt sich aus den Migrationszeiten des internen Standards während der Proteinuntersuchung mit Hilfe der Gl. 12, 21 und 22 die wahrscheinliche Migrationszeit von Acetanilid berechnen. Beim Vergleich der gemessenen  $t_{\text{Mig}}$ -Werte mit den berechneten läßt sich eine Zuordnung treffen. Für die Läufe 1-14 differieren die Werte durchschnittlich um 1,5 s. Zur Kontrolle vergleicht man die korr. AU-Werte von Acetanilid aus den Kontrollversuchen mit denen des vermeintlichen Peaks.

Ab dem 16. Lauf sind die Signale von Myoglobin und Acetanilid Basislinien-getrennt, gleichzeitig nehmen die Migrationszeiten rapide zu (s. Lauf 20, Abb. 5.78). In den letzten Läufen der Meßreihe läßt sich der EOF-Marker nicht mehr detektieren, während sich die Form des Myoglobin-Peaks stark verändert. Die massiven Probleme bei der Reproduzierbarkeit in den Läufen 16-30 spiegeln sich auch in den Resultaten der statistischen Auswertung wieder (s. Tab. 5.7.1.3.1 und 5.7.1.3.2).

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	7,223	5,753	8,694	4,110	56,896	16,88905
Fläche [AU·min]	Myoglobin	56,626	29,678	83,574	75,308	132,993	5671,28187
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	6,126	4,466	7,786	4,639	75,725	21,52141

Tabelle 5.7.1.3.2: Myoglobin, pH 6,0 (MYOG-041004)

In den abschließenden Kontrollläufen läßt sich Acetanilid zunächst detektieren, wobei sich die Migrationszeiten nach 10 Läufen bei etwa 4,5 min eingependelt haben. Ab dem 11. Lauf nehmen die Werte deutlich zu. Diese Beobachtung wird so interpretiert, daß noch adsorbiertes Myoglobin in den ersten Kontrollläufen ausgewaschen wird und dadurch die elektroosmotische Mobilität zunimmt. Die anschließend auftretende Zunahme steht möglicherweise mit Alterungsprozessen der verbliebenen Proteinplaques in Zusammenhang.

#### 5.7.1.4 Untersuchungen bei pH 6,5

Für die Meßreihe bei pH 6,5 wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 25 kV durchgeführt (vgl. Kap. 9.8.4). Bei der Prüfung der Systemstabilität streut die elektroosmotische Mobilität des Systems um 1,86%, wobei die Migrationszeiten von Acetanilid davon stärker betroffen sind, als

die von Neostigmin ( $\text{RSD}\%(\text{t}_{\text{Mig}})=1,05\%$ ). Die große Streuung der Flächenwerte bei beiden Analyten (5,36-5,76%  $\text{RSD}\%$ ) ist auf Ungenauigkeiten des Injektionssystems zurückzuführen (s. Tab. 5.7.1.4.1). Diese lassen sich durch die Berechnung der relativen Flächen aber auf unter 1,15% reduzieren.

MYOG-121004			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	3,757	3,731	3,782	0,072	1,910	0,00515
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	25,613	25,095	26,132	1,450	5,662	2,10291
korrr. Fläche	[AU]		Acetanilid	6,820	6,679	6,961	0,393	5,763	0,15450
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	5,113	5,079	5,147	0,095	1,861	0,00905
Experiment									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	4,231	4,161	4,301	0,197	4,651	0,03873
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	88,494	85,733	91,254	7,714	8,717	59,49965
korrr. Fläche	[AU]		Acetanilid	20,908	20,396	21,419	1,429	6,834	2,04157
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	4,548	4,470	4,626	0,218	4,796	0,04758

Tabelle 5.7.1.4.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 6,5 EOF-Marker

Unter den Versuchsbedingungen nimmt die effektive Ladung des Proteins im Vergleich zu den bisher durchgeführten Meßreihen weiter ab. Neben der offenen Frage, inwiefern die Proteinadsorption durch das veränderte Oberflächenpotential des Proteins beeinflusst wird, soll auch geklärt werden, ob sich die Reproduzierbarkeit bei pH 6,5 verbessern läßt.

In Abb. 5.79 ist ein Teil der Elektropherogramme dargestellt. Diese zeigen, daß sich das Peakmuster über die gesamte Versuchsreihe hinweg reproduzieren läßt. Die Migrationszeiten der Analyten weisen  $\text{RSD}\%$ -Werte von etwa 2,97-4,65% auf. Die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität verursacht diese Schwankungen, die bereits auf eine Proteinadsorption hinweisen. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß sich die Maxima der überlappenden Peaks von Acetanilid (2) und Myoglobin (3) im Verlauf der Untersuchungen weiter voneinander entfernen. Die bessere Trennung der Analyte beruht auf der Abnahme des EOF. Die Identifizierung der Signale erfolgt auf die gleiche Weise wie in Kapitel 5.7.1.3, wobei die Abweichung zwischen berechneter und gemessener Migrationszeit von Acetanilid durchschnittlich 5 s beträgt.

Die Integration der Elektropherogramme liefert lediglich für Neostigmin (1) verlässliche Werte, da bei Acetanilid und Myoglobin nur die kumulierte Peakfläche bzw. korrigierte Peakfläche sicher bestimmt werden kann (s. Tab. 5.7.1.4.1). Die in Tabelle 5.7.1.4.2 zusammengefaßten Ergebnisse für das Protein beruhen darauf, daß durch erneute Integration des Peakclusters der Acetanilid-Peak bestimmt und durch Diffe-

renzbildung der Flächen die Werte für Myoglobin berechnet werden. Da sich die Peaks nicht gleichbleibend überschneiden, schwanken die Werte erheblich.

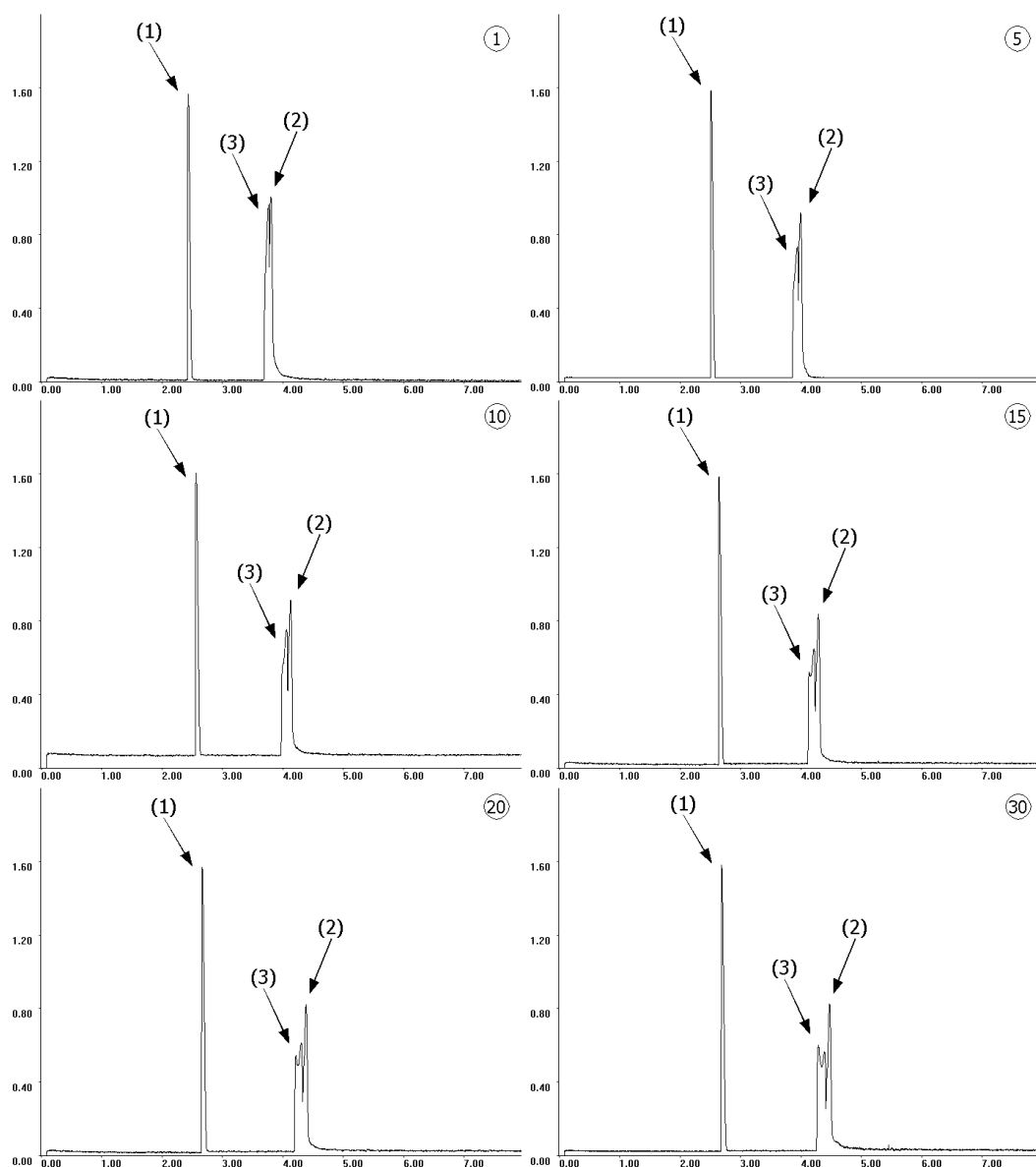


Abbildung 5.79: Myoglobin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; MYOG-121004)  
Phosphat-Puffer pH 6,5  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 48 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	4,114	4,062	4,166	0,145	3,526	0,02104
Fläche [AU·min]	Myoglobin	21,657	19,886	23,428	4,950	22,857	24,50430
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	5,242	4,772	5,712	1,314	25,060	1,72565

Tabelle 5.7.1.4.2: Myoglobin, pH 6,5 (MYOG-121004)

### 5.7.1.5 Untersuchungen bei pH 7,0

Bei dieser Versuchsreihe wird ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet, dessen pH nahezu identisch ist mit dem IP des Proteins. Daher soll in dieser Meßreihe geprüft werden, ob eine Trennung von Acetanilid und Myoglobin möglich ist und ob im Verlauf

der Untersuchungen sich die Peakform verändert. Sofern eine ansatzweise Trennung der Analyten möglich ist, bleibt die Frage zu beantworten, ob eine Peakidentifizierung möglich ist, die auf der Berechnung der Migrationszeiten über  $\mu_{\text{eff}}(\text{Neostigmin})$  basiert. Aus diesem Grund ist es ausgesprochen wichtig, daß in den Kontrollversuchen zur Systempräzision möglichst geringe Abweichungen auftreten. Die Ergebnisse von Acetanilid sind in Tab. 5.7.1.5.1 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß die Voraussetzungen erfüllt sind, um eine Identifizierung der Substanzen durch den Vergleich der gemessenen und berechneten Migrationszeiten vornehmen zu können.

MYOG-281004	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,551	3,544	3,558	0,019	0,526	0,00035
Fläche [AU·min]	Acetanilid	26,322	26,232	26,412	0,251	0,954	0,06302
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,413	7,387	7,439	0,073	0,988	0,00536
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,407	5,397	5,418	0,029	0,531	0,00082
Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,535	3,516	3,555	0,054	1,516	0,00287
Fläche [AU·min]	Acetanilid	72,720	72,257	73,183	1,293	1,779	1,67312
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	20,405	20,175	20,634	0,641	3,142	0,41101
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,432	5,402	5,462	0,083	1,531	0,00691

Tabelle 5.7.1.5.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 7,0 EOF-Marker

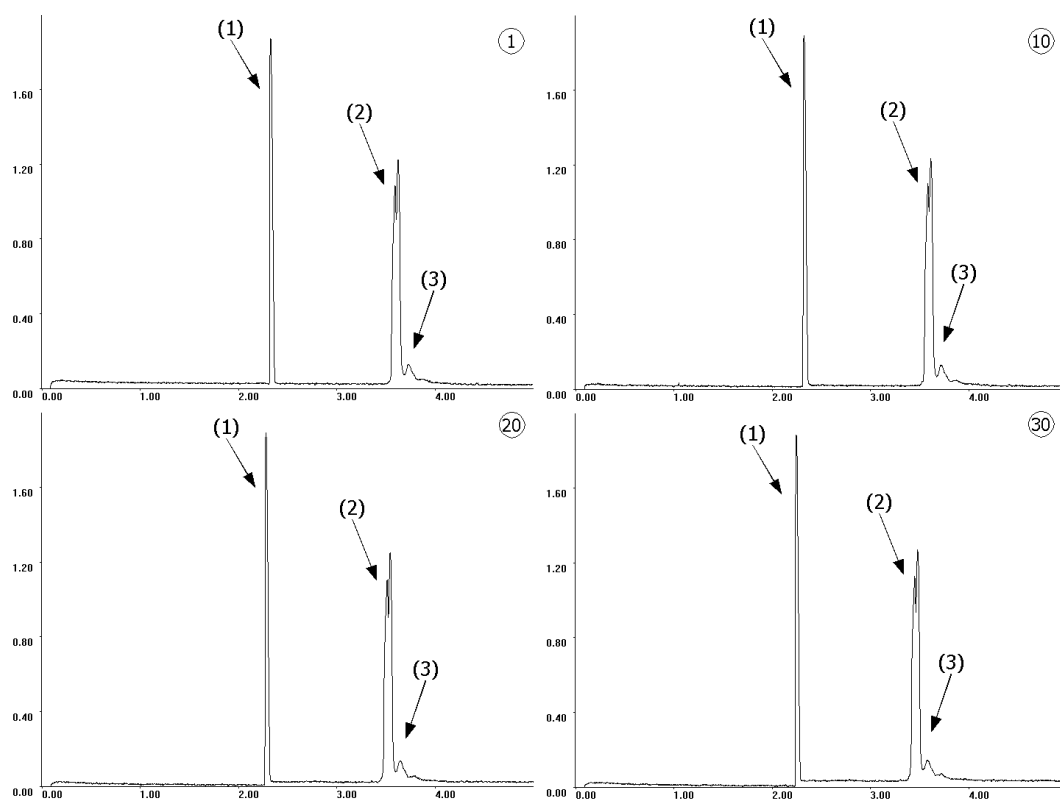


Abbildung 5.80: Myoglobin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; MYOG-281004)  
Phosphat-Puffer pH 7,0 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I  $\sim 62$   $\mu$ A; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin



Bei der anschließenden Untersuchung von Myoglobin zeigt sich, daß das Peakmuster sehr gut reproduzierbar ist (s. Abb. 5.80). Die Schwankungen der Migrationszeiten sind im Vergleich zum System-Test etwas größer mit 1,39-1,52% RSD%, jedoch liegt kein erkennbarer Trend zu geringeren Migrationsgeschwindigkeiten vor. Die Elektropherogramme zeigen auch, daß sich Acetanilid (2) und Myoglobin (3) in ihren effektiven Mobilitäten so weit unterscheiden, daß eine Trennung unter diesen Bedingungen möglich ist. Der Abstand zwischen den Peak-Maxima beträgt maximal 2 s während der gesamten Meßreihe. Beim Vergleich der gemessenen Migrationszeiten mit dem berechneten Wert, beruhend auf dem Neostigmin-Peak (1), tritt das Problem auf, daß beide Peaks im Mittel um etwas über 1 s von dem Bezugswert abweichen.

Die Zeitunterschiede weisen gleichzeitig auch eine Standardabweichung von 1 s auf. Daher erfolgt die Identifizierung dadurch, daß das erste und das letzte Elektropherogramm der Myoglobin-Untersuchung mit dem jeweils nächsten Kontrollversuch verglichen werden. Durch diesen direkten Vergleich zeigt sich, daß das Protein eine etwas geringere Migrationsgeschwindigkeit aufweist als der EOF-Marker.

Bei der Auswertung stellt sich erneut das Problem, daß nur die Peakflächen von Neostigmin eindeutig bestimmt werden kann, bei den überlagerten Peaks ist dies nicht möglich. Die kumulierten Werte für AU und korr. AU sind in Tab. 5.7.1.5.1 bei Acetanilid angegeben, während die Zahlen in Tab. 5.7.1.5.2 darauf basieren, daß von der Gesamtfläche die durchschnittliche Peakfläche von Acetanilid subtrahiert wird. Im Gegensatz dazu liegen die Abweichungen beim internen Standard bei 0,98% (AU) bzw. 1,37% RSD% (korr. AU). Bei den abschließenden Kontrollversuchen nehmen die Migrationszeiten beider Analyte tendenziell ab, die Schwankungen sind aber mit 0,87 % bzw. 1,12% geringer als bei der Untersuchung des Proteins.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	3,565	3,546	3,585	0,054	1,503	0,00287
Fläche [AU·min]	Myoglobin	46,643	46,181	47,106	1,293	2,773	1,67312
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	20,405	20,175	20,634	0,641	3,142	0,41101

Tabelle 5.7.1.5.2: Myoglobin, pH 7,0 (MYOG-281004)

Außerdem liegen die Mittelwerte unter denen Resultaten des System-Tests zu Beginn der Versuchsreihe, so daß keine Anzeichen existieren, die auf eine meßbare Proteinadsorption hinweisen. Auch die Werte der Peakflächen von Neostigmin und Acetanilid weisen keine signifikant erhöhten Schwankungen auf.

### 5.7.1.6 Untersuchungen bei pH 8,0

Aufgrund der Ergebnisse, die bei pH 7,0 erhalten werden, soll durch die Verwendung eines 50 mM Phosphat-Puffers mit pH 8,0 geprüft werden, ob eine Quantifizierung von Myoglobin unter diesen Bedingungen möglich ist (vgl. Kap. 9.8.6). Bei diesem pH-Wert ist das Protein negativ geladen, so daß keine Interferenzen mit dem EOF-Marker zu erwarten sind. Gleichzeitig liegen keine stark denaturierenden Bedingungen vor, welche die Stabilität des Makromoleküls beeinträchtigen. Zunächst wird die Stabilität des CE-Systems geprüft. Die Kontrollreihe zeigt, daß sowohl die Migrationszeiten als auch die Peakflächen stabil sind (vgl. Tab. 5.7.1.6.1).

MYOG-031104 Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,494	2,488	2,500	0,017	0,684	0,00029
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	19,162	19,088	19,236	0,207	1,082	0,04296
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,684	7,649	7,719	0,098	1,276	0,00962
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	7,700	7,681	7,718	0,052	0,680	0,00274
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,560	2,549	2,570	0,030	1,167	0,00089
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	18,545	18,456	18,634	0,248	1,340	0,06172
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,246	7,211	7,280	0,097	1,342	0,00945
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	7,502	7,470	7,533	0,088	1,171	0,00772

Tabelle 5.7.1.6.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 8,0 EOF-Marker

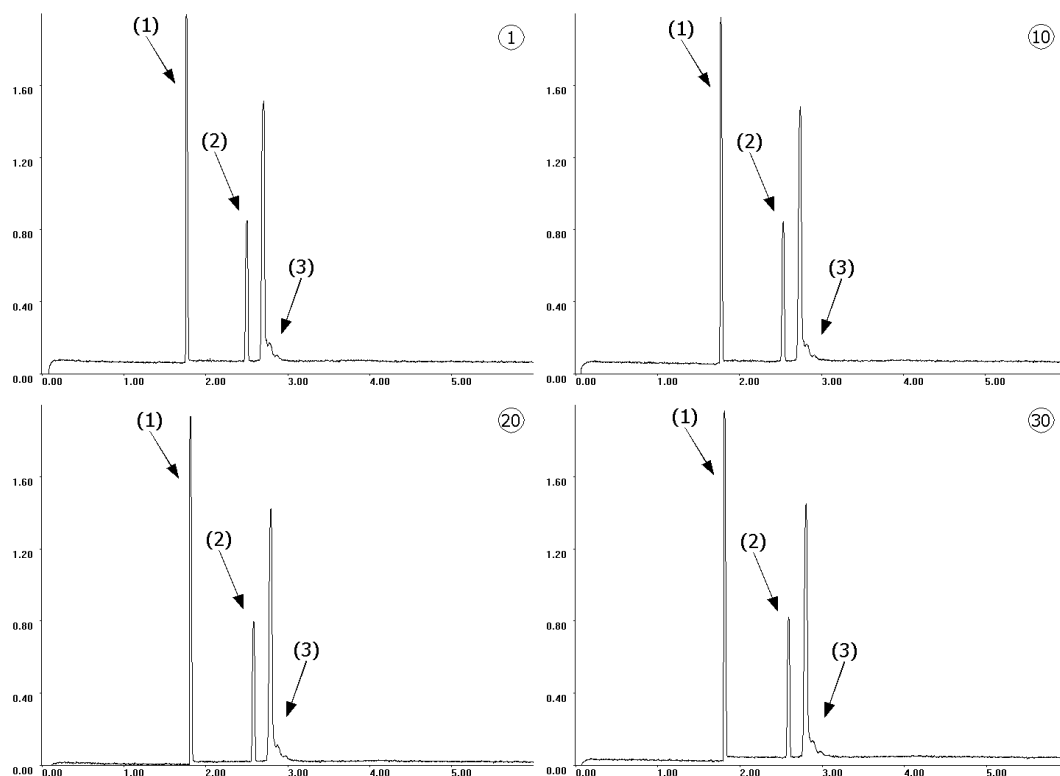


Abbildung 5.81: Myoglobin (~ 7 ng pro Injektion; MYOG-031104)  
Phosphat-Puffer pH 8,0 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 78 µA; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Die Elektropherogramme in Abb. 5.81 zeigen ein reproduzierbares Muster, bei dem die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und Myoglobin (3) stabil sind. Des weiteren sind keine Veränderungen der Peakformen zu erkennen. Die Auswertung der Meßwerte ergibt, daß die Migrationszeiten eine etwas größere RSD% von <1,17% aufweisen, wobei die Spanne zwischen den Extrema höchstens 7 s beträgt. Die Peakflächen streuen im Vergleich zu den Kontrollmessungen ebenfalls stärker (vgl. Tab. 5.7.1.6.1), liegen aber im Rahmen der Gerätespezifikationen. Auch die Flächenwerte von Myoglobin weisen etwas größeren Schwankungen auf, was jedoch auf die Schulter des Proteinpeaks zurückzuführen ist. Sie führt dazu, daß die Software die Integrationsgrenzen schlechter reproduziert.

Die Ergebnisse, die für Myoglobin erhalten werden (vgl. Tab. 5.7.1.6.2), zeigen aber auch, daß die Reproduzierbarkeit noch weiter verbessert werden kann, wenn die Methodenparameter entsprechend optimiert werden.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	2,769	2,758	2,780	0,031	1,122	0,00096
Fläche [AU·min]	Myoglobin	48,705	48,503	48,907	0,564	1,158	0,31804
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	17,592	17,501	17,684	0,255	1,447	0,06485

Tabelle 5.7.1.6.2: Myoglobin, pH 8,0 (MYOG-031104)

Bei den anschließenden Kontrollversuchen treten keine weiteren Veränderungen des Systems auf. Die RSD%-Werte der Migrationszeiten liegen unter 1%, die der Flächen bzw. korrigierten Flächen zwischen 1,22 und 1,47%. Daher kann davon ausgegangen werden, daß mögliche Proteinadsorbate zu keinen nachhaltigen Beeinträchtigungen der Systemstabilität führen.

#### 5.7.1.7 Untersuchungen bei pH 8,4

Bei der Charakterisierung des elektrophoretischen Verhaltens von Myoglobin wird zusätzlich untersucht, ob sich die Robustheit der Methode durch den verwendeten Puffer beeinflusst wird, wie im Fall der boviner Catalase (pH 9,2, s. Kap. 5.4.2). Daher wird ein 120 mM Borat-Puffer, pH 8,4, verwendet. Alle anderen Methodenparameter (s. Kap. 9.8.7) werden im Vergleich zur Meßreihe MYOG-031104 unverändert gelassen. Auch bei dieser Meßreihe werden zunächst Kontrollversuche durchgeführt, um die systemimmanenten Schwankungen zu ermitteln. Die in Tab. 5.7.1.7.1 zusammengestellten Resultate weisen generell höhere Schwankungen auf als die Vergleichswerte bei Verwendung des Phosphat-Puffers. Zu den RSD%-Werten der Flä-

chen trägt unter anderem auch das Injektionssystem bei. Durch die Berechnung der relativen AU- und korr. AU-Werte lassen sich die Streuungen auf 1,63% reduzieren.

MYOG-150903			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	2,607	2,592	2,621	0,033	1,284	0,00112
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	34,032	33,613	34,452	0,957	2,812	0,91569
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	13,057	12,902	13,213	0,355	2,721	0,12626
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	7,367	7,326	7,408	0,094	1,272	0,00878
Experiment									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Acetanilid	2,518	2,514	2,523	0,012	0,493	0,00015
Fläche	[AU·min]		Acetanilid	30,028	29,610	30,446	1,168	3,889	1,36379
korr. Fläche	[AU]		Acetanilid	11,925	11,747	12,104	0,499	4,181	0,24861
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Acetanilid	7,624	7,611	7,638	0,038	0,493	0,00141

Tabelle 5.7.1.7.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 8,4 EOF-Marker

Vergleicht man die Elektropherogramme, die bei Verwendung des Borat-Puffers aufgenommen werden (s. Abb. 5.82), mit denen aus der vorausgegangenen Meßreihe, lassen sich keine grundsätzlichen Unterschiede beobachten. Die Migrationszeiten der Analyten zeigen mit RSD%-Werten von unter 0,65% sogar eine bessere Reproduzierbarkeit als bei Verwendung des Phosphat-Puffers.

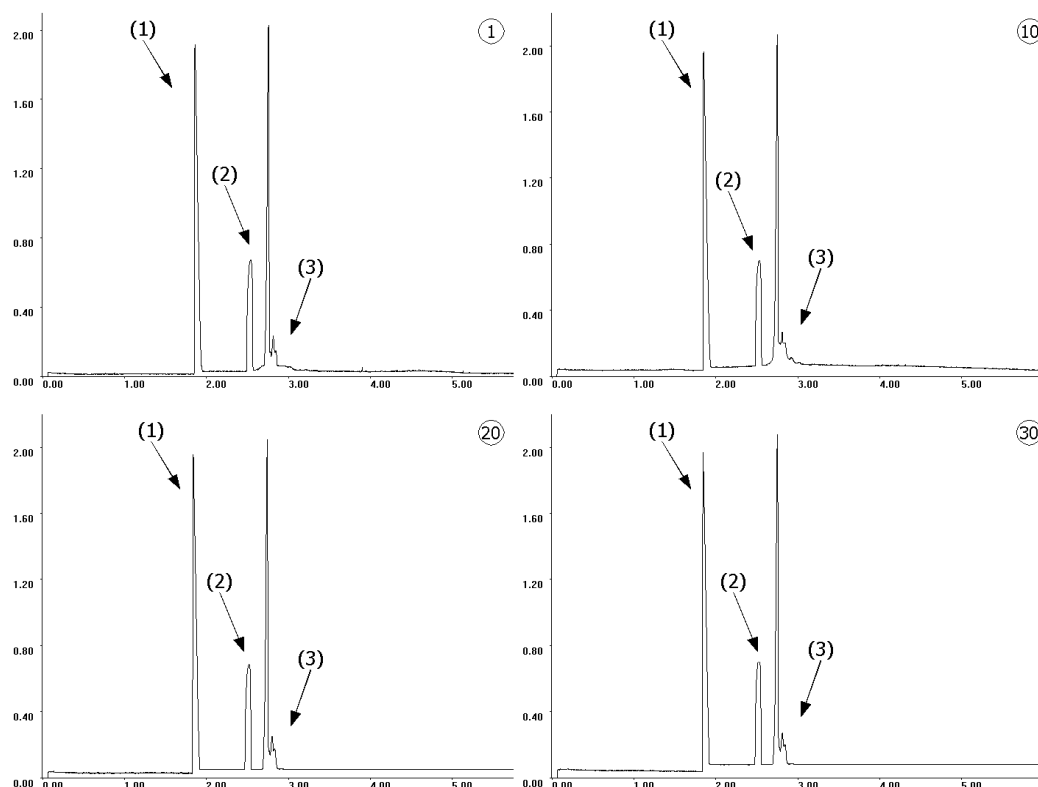


Abbildung 5.82: Myoglobin ( $\sim 6$  ng pro Injektion; MYOG-150903)  
Borat-Puffer pH 8,4  $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 36 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Im Gegensatz dazu streuen die Werte der Peakflächen stärker. Im Fall von Neostigmin (1) liegen die Abweichungen mit 1,72 bzw. 2,14% RSD% noch geringer als bei

Acetanilid (2) und Myoglobin (3; vgl. Tab. 5.7.1.7.1 und 5.7.1.7.2). Die Abweichungen bei den Werten können teilweise auf die Probeinjektion zurückgeführt werden. Bezieht man die Flächenwerte von Acetanilid auf die Vergleichsgrößen des internen Standards, reduzieren sich die RSD% auf 3,10%. Im Fall des Proteins bringt diese Maßnahme keine deutlichen Verbesserungen. Bei genauerer Betrachtung der Elektropherogramme fällt auf, daß der Verlauf der Basislinie im Bereich des Myoglobin-Peaks unregelmäßige Schwankungen aufweist. Zusätzlich liegen zwei deutlich erkennbare Proteinfractionen vor. Das führt dazu, daß die Peakgrenzen bei einzelnen Läufen falsch gesetzt werden und die Integrationssoftware bei der Berechnung von zu breiteren Integralen ausgeht. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Peakflächen verschlechtert.

Schließt man die betreffenden vier Meßwerte von der statistischen Berechnung aus, reduzieren sich die RSD%-Werte auf etwa 4,1%. Allerdings bleibt auch dann die Reproduzierbarkeit deutlich schlechter als bei pH 8,0. Die Probleme scheinen allerdings nicht durch Adsorptionsprozesse verursacht zu werden, da sich die elektroosmotische Mobilität während der Proteinuntersuchung und den abschließenden Kontrollversuchen nur unwesentlich ändert (RSD%=0,51%) und im Vergleich zu den einleitenden Kontrollversuchen sogar geringfügig erhöht.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Myoglobin	2,740	2,736	2,744	0,011	0,415	0,00013
Fläche [AU·min]	Myoglobin	49,678	48,456	50,899	3,413	6,870	11,64629
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	18,133	17,674	18,592	1,283	7,073	1,64518

Tabelle 5.7.1.7.2: Myoglobin, pH 8,4 (MYOG-150903)

Daher bleibt ungeklärt, was zu der schlechteren Reproduzierbarkeit der Flächen führt, zumal sich diese Beobachtung in Wiederholexperimenten reproduzieren läßt.

### 5.7.1.8 Untersuchungen bei pH 9,2

Aufgrund der vergleichsweise schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei pH 8,4 soll durch die Untersuchungen bei pH 9,2 geklärt werden (vgl. Kap. 9.8.8), ob die Schwierigkeiten grundsätzlich in Zusammenhang mit Borat-Puffern auftreten oder ob es sich um ein für den pH-Wert von 8,4 spezifisches Problem handelt. Vor der Untersuchung wird die Systemstabilität in 30 aufeinander folgenden Läufen getestet. Die Ergebnisse zeigen, daß nur geringe Schwankungen auftreten (s. Tab. 5.7.1.8.1), die zwischen 0,43 und 0,97% RSD% liegen.

## 5 Kapillarzzonelektrophorese (CZE)

MYOG-091204		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,904	2,899	2,908	0,013	0,431	0,00016
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	29,948	29,867	30,029	0,227	0,758	0,05149
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	10,314	10,278	10,350	0,100	0,973	0,01007
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,612	6,602	6,622	0,029	0,431	0,00081
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	2,921	2,905	2,937	0,044	1,502	0,00193
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	33,318	33,200	33,435	0,328	0,983	0,10732
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	11,409	11,352	11,465	0,159	1,391	0,02520
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,575	6,540	6,610	0,098	1,494	0,00964

Tabelle 5.7.1.8.1: Myoglobin-Untersuchung, pH 9,2 EOF-Marker

Die bei der Untersuchung von Myoglobin (3) aufgenommenen Elektropherogramme zeichnen sich dadurch aus, daß das Peakmuster gut reproduzierbar ist (s. Abb. 5.83).

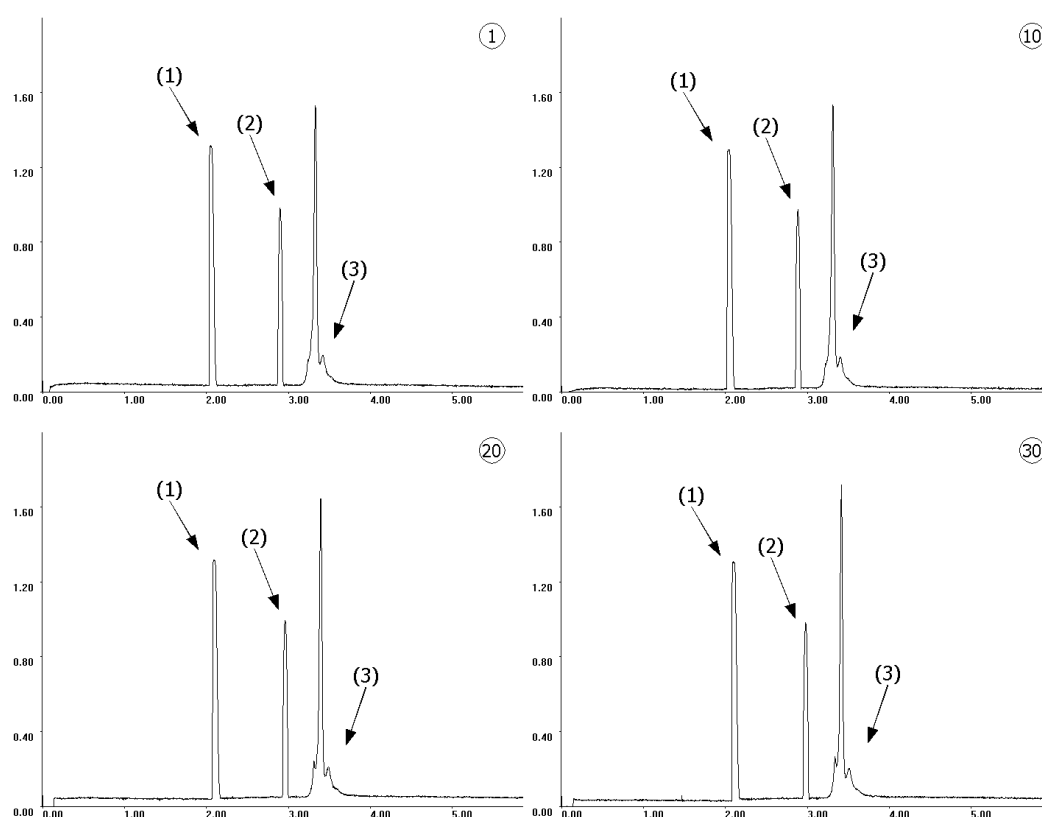


Abbildung 5.83: Myoglobin (~ 6 ng pro Injektion; MYOG-091204)  
Borat-Puffer pH 9,2 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 38 µA; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Im Vergleich zu den Kontrollversuchen und der Meßreihe MYOG-150903 bei pH 8,4 streuen die Migrationszeiten mit 1,41-1,50% RSD% merklich stärker. Vergleicht man die Spanne der  $t_{\text{Mig}}$ -Werte der Analyten, ist der maximale Unterschied zwischen den Einzelwerten bei Acetanilid (2) mit knapp 6 s deutlich größer ist als bei Myoglobin und Neostigmin. Die zeitlichen Unterschiede betragen in beiden Fällen lediglich 2 s.

Bei der genauen Betrachtung der Elektropherogramme läßt sich feststellen, daß sich der Proteinpeak aus mehreren überlagernden Fraktionen zusammensetzt. Diese lassen sich an den mehr oder weniger ausgeprägten Schultern erkennen. Darüber hinaus werden keine störenden Basislinienschwankungen beobachtet. Dies wirkt sich auch die Reproduzierbarkeit der Peakflächen aus. Deren relative Standardabweichung beträgt zwischen 0,96 und 1,67%, wobei die Streuung der korr. AU-Werte durchschnittlich 0,5% höher liegt als bei den absoluten Flächen. Bezieht man jedoch die Einzelwerte von Acetanilid und Myoglobin auf die jeweilige Meßgröße des internen Standards, reduzieren sich die Abweichungen auf 1,01% RSD%. Die gemessenen Schwankungen lassen sich auch hier auf das Injektionssystem zurückführen. Im Fall der absoluten Flächen kompensieren sich die Schwankungen, die durch die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verursacht werden, und der Injektionsfehler, so daß keine auffälligen Streuungen beobachtet werden. Insgesamt läßt sich bei Myoglobin unter den Versuchsbedingungen gut quantifizieren, wobei sich die Präzision durch zusätzliche Optimierungsarbeiten weiter verbessert werden kann.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	3,353	3,336	3,370	0,047	1,407	0,00223
Fläche [AU·min]	Myoglobin	68,167	67,831	68,503	0,938	1,376	0,88004
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	20,332	20,211	20,453	0,339	1,668	0,11500

Tabelle 5.7.1.8.2: Myoglobin, pH 9,2 (MYOG-091204)

Bei den anschließend durchgeführten Kontrollexperimenten lassen sich Schwankungen der Flächenwerte, aber auch der Migrationszeiten nicht reproduzieren. Vielmehr betragen die RSD%-Werte aller relevanten Größen unter 0,88% RSD%. Da die Meßwerte aus der Proteinuntersuchung keinen erkennbaren Trend aufweisen, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die ermittelten Schwankungen proteinimmanent sind, was jedoch nicht nachgewiesen werden kann.

### 5.7.1.9 Diskussion der Teilergebnisse

Die durchgeführten kapillarzonenelektrophoretischen Untersuchungen zeigen im Vergleich zu den anderen Modellproteinen, daß weniger Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Meßwerte auftreten. Die in Abb. 5.84 graphisch zusammengefaßten Meßwerte des internen Standards zeigen, daß bei pH 5,0 bis 6,0 deutliche Probleme mit der Reproduzierbarkeit auftreten. Die Diagramme zeigen auch, daß unter kritischen Bedingungen die Bezugsgröße selbst deutlichen Schwankungen unterliegt. Die Er-

gebnisse lassen sich nur bedingt dadurch verbessern, indem man andere Meßgrößen auf die Werte des internen Standards bezieht. Gleichzeitig lassen sich eventuelle Probleme unabhängig von der Probeninjektion an den korr. AU-Werten ablesen.

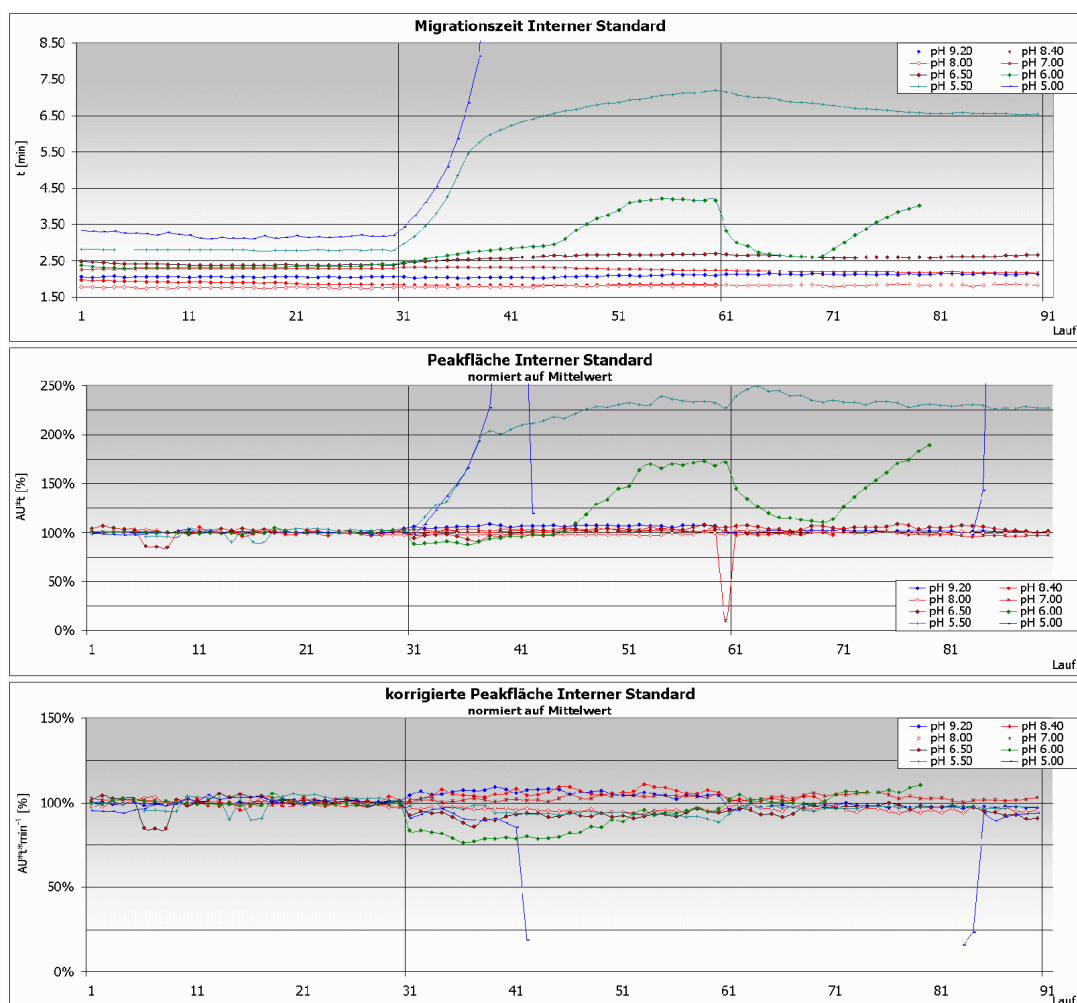


Abbildung 5.84: Myoglobin-Untersuchungen; Ergebnisse interner Standard ( $t_{\text{Mig}}$ , AU, korr. AU)

Die Versuchsreihen bei pH 5,0 bis 6,0 und 8,4 bestätigen diese Vorgehensweise, um möglicherweise kritische Bedingungen bereits im Vorfeld erkennen zu können.

Eine weitere Meßgröße, die auf Probleme mit der Adsorption von Myoglobin hinweist, ist die elektroosmotische Mobilität. Als direkte Meßgröße für den EOF reagiert sie empfindlich auf Veränderungen der Kapillaroberfläche, beispielsweise durch die Ausbildung von Proteinplaques. Daher ist es notwendig, vor der Quantifizierung eines makromolekularen Analyten die Systempräzision zu bestimmen. Nur durch den Vergleich der Schwankungen vor und nach der Bestimmungsmethode lassen sich proteinimmanente Einflüsse von äußeren Faktoren unterscheiden wie zum Beispiel Temperaturschwankungen.



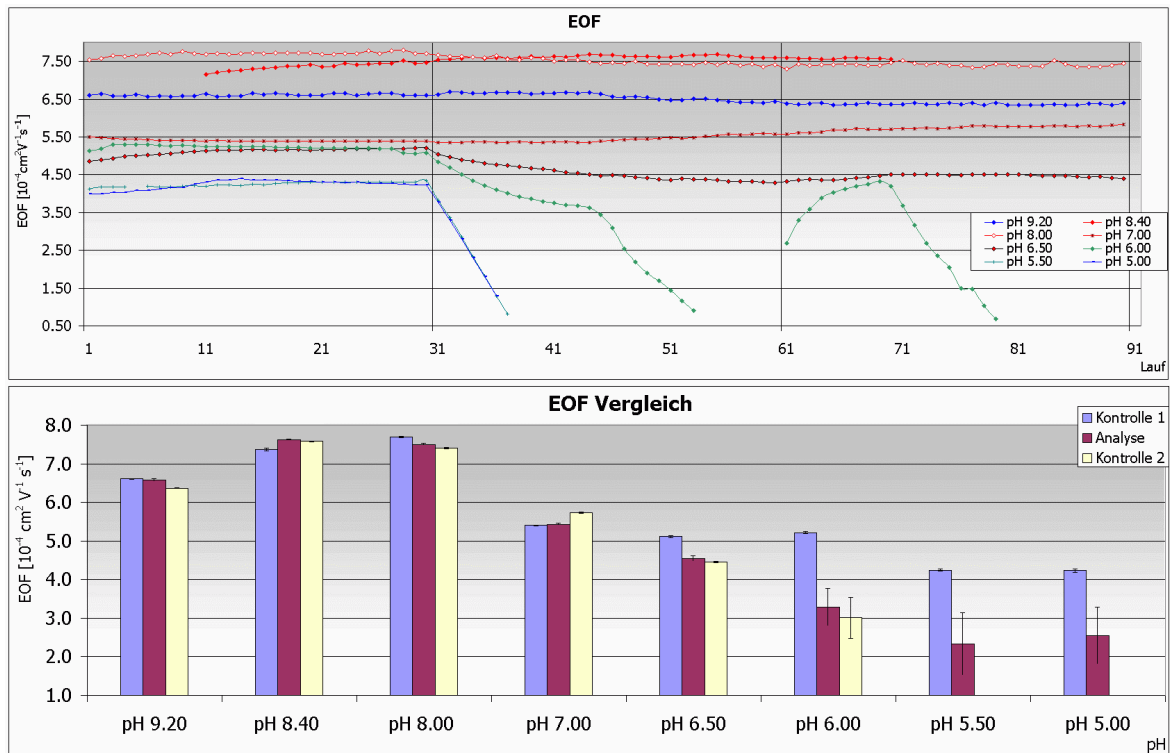


Abbildung 5.85: Myoglobin; EOF Balkendiagramme

In Abb. 5.85 sind einerseits die Meßwerte graphisch dargestellt (oben), andererseits sind im Balkendiagramm (unten) die Mittelwerte mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen wiedergegeben. Das Balkendiagramm weist den Vorteil auf, daß sich auch kleine Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Werten visualisieren lassen und durch die eingezeichneten Vertrauensintervalle auf signifikante Unterschiede geprüft werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, daß unterhalb von pH 7,0 eindeutige Veränderungen des EOF innerhalb der Meßreihen auftreten, so daß von deutlichen Veränderungen der Kapillaroberfläche ausgegangen werden muß. Bei pH 7,0 ist die Beurteilung weniger eindeutig, da Mittelwerte und Konfidenzintervalle kaum Unterschiede aufweisen, was nicht auf mögliche Adsorptionsprozesse hinweist. Im Gegensatz dazu beobachtet man bei den abschließenden Kontrollmessungen eine Zunahme des EOF. Dieses Phänomen weist sonst darauf hin, daß adsorbiertes Protein ausgewaschen wird. Die frei werdenden Areale tragen zur Generierung der elektroosmotischen Mobilität bei, wodurch der gemessene  $\mu_{\text{EOF}}$ -Wert zunimmt. Daher läßt sich an dieser Stelle keine Entscheidung bezüglich der Adsorption treffen.

Bei pH 8,0 und 9,2 liegen die  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte der abschließenden Kontrollmessungen geringfügig niedriger als bei der Untersuchung von Myoglobin. Dies kann darauf hinwei-

sen, daß ein Teil Proteins an der Oberfläche adsorbiert wird. Die Abnahme ist allerdings so gering, daß auch Temperatureinflüsse nicht ausgeschlossen werden können. Deshalb läßt sich anhand des EOF noch nicht entscheiden, ob Myoglobin partiell adsorbiert. Bei pH 8,4 nimmt der EOF während der Proteinuntersuchung zu, was für eine Abnahme der Viskosität und/oder Temperaturschwankungen, nicht aber für Adsorptionsprozesse spricht. Ein Einfluß des Proteins kann auch insofern ausgeschlossen werden, als daß sich die hydrodynamischen Eigenschaften der Proteinlösung bei pH 8,0 und 9,2 nicht verändern.

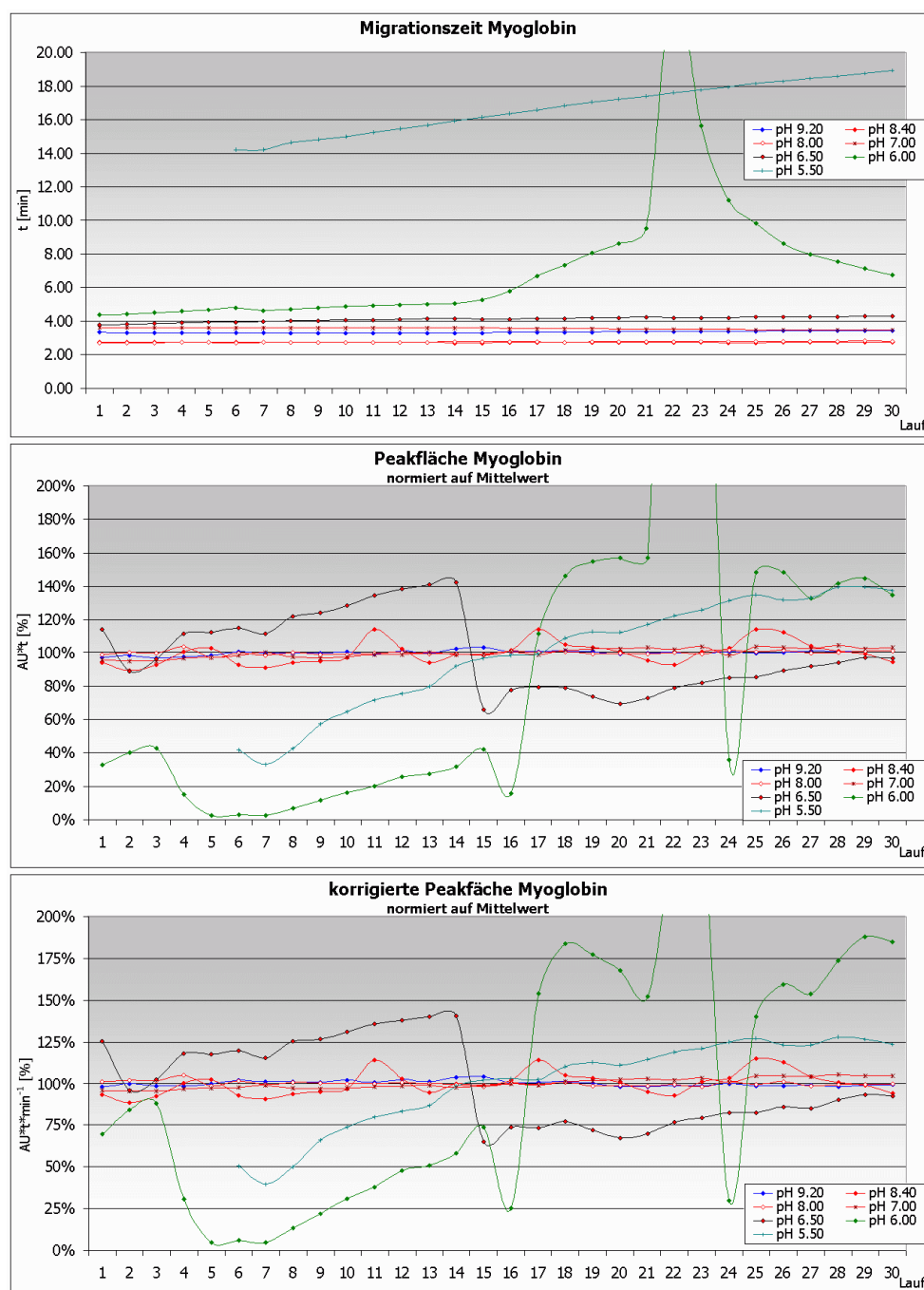


Abbildung 5.86: Ergebnisse Myoglobin; AU und korr. AU normiert auf Mittelwert

In Abb. 5.86 sind die Ergebnisse von Myoglobin graphisch dargestellt. Um die Flächen und korrigierten Flächen besser optisch miteinander vergleichen zu können, werden die Einzelwerte auf das arithmetische Mittel bezogen. Die Diagramme zeigen deutlich, daß bei pH 5,5 und 6,0 sich die Meßwerte nur sehr begrenzt reproduzieren lassen. Darüber hinaus muß berücksichtigt werden, daß durch das Überlappen von Protein- und Acetanilid-Peak die Flächen von Myoglobin nur ungenau bestimmt werden können. Daher ist zu erwarten, daß im Bereich zwischen pH 6,0 und 7,0 deutlich präzisere Resultate erreicht werden können, wenn man darauf verzichtet, einen EOF-Marker zu verwenden. Die Untersuchungen bei pH 8,0 und 9,2 zeigen, daß sowohl die absoluten als auch die korrigierten Peakflächen nur geringfügig schwanken.

Im Unterschied dazu beobachtet man bei pH 8,4 größere Abweichungen vom Mittelwert der (korrigierten) Flächenwerte von Myoglobin. Die RSD% der Migrationszeiten des Proteins beträgt 0,42% und jene der elektroosmotischen Mobilität 0,49%. Die Abweichungen bei den Flächenwerten lassen sich durch die Bildung relativer Peakflächen reduzieren, liegen aber auch dann über 5,0% RSD%. Im Verhältnis zu den Flächenwerten von Acetanilid und Neostigmin läßt sich bei Myoglobin trotz der Schwankungen eine zunehmende Tendenz erkennen, die sich reproduzieren läßt. Eine Proteinadsorption läßt sich jedoch aufgrund der sehr gut reproduzierbaren Migrationszeiten nicht belegen.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigt sich, daß die Eigenschaften von Myoglobin sich weniger auf die zonenelektrophoretische Analytik auswirken. Im Vergleich zu den anderen Modellproteinen läßt sich der makromolekulare Analyt auch bei pH-Werten unterhalb des IP detektieren. Die Untersuchungen bei pH 6,5 stellen einen Grenzfall dar. Neben der Proteinadsorption trägt das Überlappen von EOF-Marker- und Myoglobin-Peak zur Streuung der Flächenwerte bei, so daß bei einem Verzicht auf Acetanilid deutlich bessere Resultate möglich sind. Die weniger stark ausgeprägte Adsorption im Vergleich zu den anderen Modellproteinen ist darauf zurückzuführen, daß die Ladungen auf der Proteinoberfläche gleichmäßig verteilt sind und somit keine positiv geladenen Bereiche existieren wie bei Cytochrom C. Aufgrund der Schwierigkeiten durch die Adsorption bei pH-Werten  $< 6,0$  läßt sich auch bei Myoglobin keine verlässliche Analytik betreiben.

### **5.7.2 Myoglobin – weiterführende Untersuchungen**

Die Untersuchungen an Myoglobin haben gezeigt, daß die kapillarzonenelektrophoretischen Eigenschaften insgesamt weniger problematisch sind als bei Cytochrom C, Catalase und  $\beta$ -Lactoglobulin. Allerdings hat sich auch gezeigt, daß bei den Versuchsreihen, die wenig unterhalb des IP des jeweiligen biogenen Analyten durchgeführt werden, große Schwierigkeiten bestehen, reproduzierbare Werte zu erhalten. Gleichzeitig ist es bei pH 5,0 und 5,5 bisher noch nicht gelungen, das jeweils untersuchte Protein in unbeschichteten Kapillaren zu detektieren. Daher soll durch weitere Untersuchungen an einem weniger kritischen Protein wie Myoglobin geklärt werden, ob die Pufferzusammensetzung im Bereich um pH 5 Einfluß auf die Reproduzierbarkeit hat. Außerdem ist noch nicht geklärt, ob sich unter kritischen Versuchsbedingungen ein Gleichgewicht zwischen Ad- und Desorption an der Kieselglasoberfläche einstellt. Verschiedene Untersuchungen des Verhaltens von Cytochrom C und Myoglobin an Grenzflächen lassen den Schluß zu, daß eine Sättigungskonzentration in der Grenzschicht existiert [123][124]. Es scheint daher möglich, daß auch in der CE einen Gleichgewichtszustand erreicht werden kann, so daß stabile Analysenbedingungen vorliegen. Ein weiterer Punkt, der bisher nur unzureichend untersucht wurde, ist die Frage, wie gut Tenside zur Desorption von Proteinplaques beitragen, auch vor dem Hintergrund der zeitlichen Abhängigkeit und möglichen Veränderungen des adsorbierten Analyten. Auf die Durchführung von Kontrollserien wird verzichtet, da aus den bisher durchgeführten Versuchsreihen bereits bekannt ist, in welchen Größenordnungen sich die Standardabweichungen bewegen.

#### **5.7.2.1 Untersuchungen bei pH 5,0 – taxigene Einflüsse**

Die Untersuchungen der bovinen Catalase bei pH 9,2 haben deutlich gezeigt, daß die verwendeten Pufferbestandteile einen Einfluß auf die Stabilität der Proteinstruktur haben. Neben Phosphat und Monohydrogenphosphat hat auch Acetat taxigene Eigenschaften. Aus diesem Grund soll durch weitere Versuche geprüft werden, ob eine Erhöhung der Acetat-Ionenkonzentration sich ähnliche Verbesserungen erzielen lassen wie durch Phosphat-Zusätze in Borat-Puffern (vgl. Kap. 5.4.2.4). Gleichzeitig muß aber auch berücksichtigt werden, daß die Ausgangsbedingungen mit einem positiv geladenen Analyten in Gegenwart einer anionischen Kieselglasoberfläche kritischer

eingestuft werden müssen. Gleichzeitig erhöht sich die Leitfähigkeit des Puffers durch die höhere Konzentration. Daher kann sich eine größere Wärmeentwicklung als kontraproduktiv erweisen, da die Tertiärstruktur destabilisiert wird.

Bei den Untersuchungen wird ein 100 mM Acetat-Puffer verwendet mit einem pH-Wert von 5,0. Die Spannung wird im Vergleich zur Standardmethode auf 30 kV erhöht, um eventuell auftretende thermische Probleme schnell erfassen zu können.

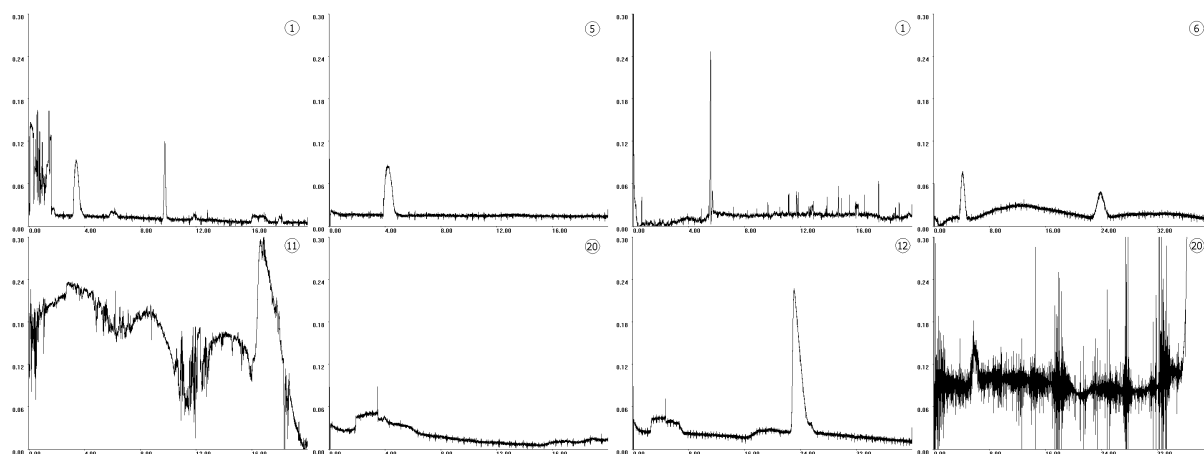


Abbildung 5.87: Myoglobin (~ 1 ng pro Injektion; MYOA-240602)

Acetat-Puffer pH 5,0 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=30 kV, I ~ 140 µA; Läufe 1, 5, 11, 20

Abbildung 5.88: Myoglobin (~ 1 ng pro Injektion; MYOA-250602)

Acetat-Puffer pH 5,0 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=30 kV, I ~ 153 µA; Läufe 1, 6, 12, 20

In den Abbildungen 5.87 und 5.88 sind einige Elektropherogramme aus zwei verschiedenen Meßreihen dargestellt. Anhand der Abbildungen wird deutlich, daß durch die Erhöhung der Ionenstärke und der Spannung keine Verbesserung der Präzision erzielt werden kann. Vielmehr ist das Gegenteil der Fall, da sich selbst das Peakmuster kaum reproduzieren läßt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-240602							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	12,533	9,780	15,286	2,809	22,411	7,88941
Fläche [AU·min]	Acetanilid	13,390	8,942	17,838	4,539	33,897	20,60161
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	1,051	0,937	1,166	0,117	11,098	0,01361
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	1,132	0,896	1,369	0,241	21,296	0,05815
MYOA-250602							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	13,288	7,485	19,090	6,620	49,819	43,82185
Fläche [AU·min]	Acetanilid	11,280	6,865	15,696	5,038	44,661	25,38002
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,890	0,725	1,055	0,188	21,100	0,03527
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	1,217	0,786	1,648	0,492	40,399	0,24188
MYOA-280602							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	5,091	4,301	5,880	1,395	27,413	1,94734
Fläche [AU·min]	Acetanilid	3,565	2,635	4,494	1,643	46,103	2,70059
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,717	0,547	0,887	0,301	41,922	0,09030
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	2,873	2,448	3,297	0,750	26,106	0,56241

Tabelle 5.7.2.1.1: Myoglobin, Ergebnisse bei pH 5,0 Acetanilid

In Tab. 5.7.2.1.1 sind die Ergebnisse von Acetanilid in den durchgeführten Meßreihen zusammengefaßt. Allerdings können die Ergebnisse nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden, da sich der EOF-Marker nicht in jedem Lauf detektieren läßt (vgl. Abb. 5.94) und entsprechend unterschiedlich große Stichproben vorliegen. Bei der Meßreihe MYOA-280602 wird im Anschluß an die Untersuchung von Myoglobin die gleiche Methode angewendet, jedoch wird anstelle der Proteinlösung eine 200 mM SDS-Lösung verwendet. Durch diese Maßnahme soll geprüft werden, ob sich adsorbiertes Protein in Form von SDS-Myoglobin Assoziaten auswaschen und detektieren läßt.

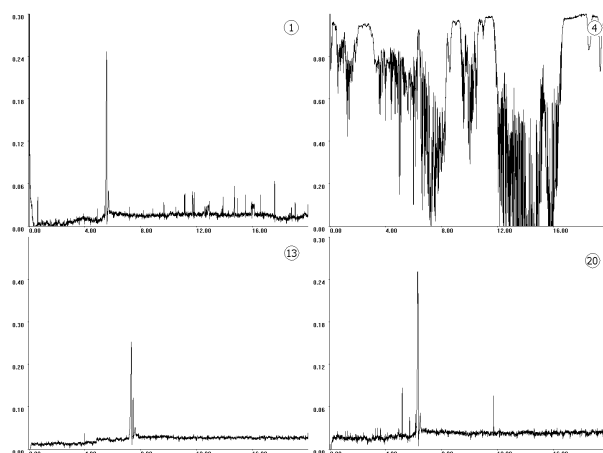


Abbildung 5.89: Myoglobin ( $\sim 1$  ng pro Injektion, MYOA-250602)  
Acetat-Puffer pH 5,0  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $200 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  SDS,  $U=30 \text{ kV}$ ,  $I \sim 153 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 4, 13, 20

In Abb. 5.89 sind einige Elektropherogramme dargestellt, die bei der Injektion der SDS-haltigen Lösung aufgenommen wurden. Bis auf wenige Läufe läßt sich der Proteinpeak sogar besser reproduzieren als bei der eigentlichen Untersuchung von Myoglobin. Die Elektropherogramme zeigen, daß sich durch die Injektion von SDS ein Teil des adsorbierten Myoglobins desorbieren läßt. Vergleicht man die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchung von Myoglobin mit den Resultaten, die bei der Verwendung des 50 mM Puffers erhalten werden (s. Kap. 5.7.1.1), muß auch bei diesen Messungen davon ausgegangen werden, daß die elektroosmotische Mobilität entweder stark vermindert ist oder sogar anodisch gerichtet ist. Da sich der Peak des SDS-Myoglobin-Assoziates nach maximal 8 min detektieren läßt, muß es sich um positiv geladene Teilchen handeln. Bei den Versuchsbedingungen ist zu berücksichtigen, daß im Gegensatz zur SDS-PAGE kein Überschuß von Tensidmolekülen vorliegt, und daß das Protein selbst positiv geladen ist. Daher läßt sich aus dem Migrationsverhalten schließen, daß pro Myoglobin-Molekül bereits wenige SDS-Moleküle ausreichen, um das Protein in eine desorbierte Form zu überführen.

### 5.7.2.2 Untersuchungen bei pH 5,3 – taxigene Einflüsse

Die im vorausgegangenen Kapitel beschriebenen Experimente zeigen, daß die Reproduzierbarkeit der Messungen durch die hohe Feldstärke beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund werden in zwei weiteren Meßreihen ermittelt, ob durch eine Reduktion der Trennungsspannung sich Verbesserungen erzielen lassen. Gleichzeitig wird der pH-Wert geringfügig erhöht, um den Einfluß der hohen Ionenstärke auf den EOF partiell kompensieren zu können.

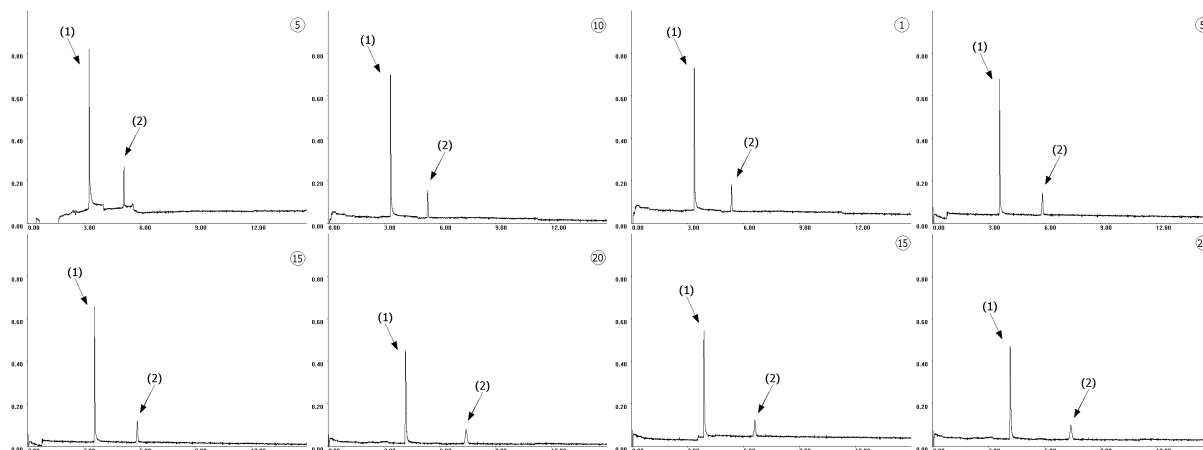


Abbildung 5.90: Myoglobin (~ 1 ng pro Injektion; MYOA-220102)

Acetat-Puffer pH 5,3 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=22 kV, I ~ 47 µA; Läufe 5, 10, 15, 20  
(1) Neostigmin und (2) Acetanilid

Abbildung 5.91: Myoglobin (~ 1 ng pro Injektion; MYOA-230102)

Acetat-Puffer pH 5,3 100 mmol·l<sup>-1</sup>, U=22 kV, I ~ 49 µA; v.l.n.r. Läufe 1, 5, 15, 20  
(1) Neostigmin und (2) Acetanilid

Die in den Abb. 5.90 und 5.91 gezeigten Elektropherogramme zeigen, daß sich das Peakmuster besser reproduzieren läßt im Vergleich zu den Meßreihen MYOA-240602, MYOA-250602 und MYOA-280602. Die Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) ist im Vergleich zu den Versuchsreihen MYO-110205 und MYO-180205 bei pH 5,0 bzw. 5,5 weniger stark ausgeprägt. Allerdings läßt sich auch unter diesen Bedingungen Myoglobin nicht detektieren.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-220102							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	6,076	5,759	6,392	0,723	11,905	0,52314
Fläche [AU·min]	Acetanilid	4,196	4,036	4,355	0,364	8,669	0,13229
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,694	0,674	0,714	0,046	6,629	0,00212
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,838	3,644	4,032	0,443	11,541	0,19620
MYOA-230102							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	9,709	8,871	10,546	1,911	19,687	3,65345
Fläche [AU·min]	Acetanilid	6,313	5,874	6,751	1,000	15,848	1,00078
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,655	0,639	0,671	0,036	5,545	0,00132
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	2,453	2,258	2,648	0,445	18,153	0,19826

Tabelle 5.7.2.2.1: Myoglobin, pH 5,25 EOF-Marker (Serien MYOA-220102 u. MYOA-230102)

Die Schwankungen der Migrationszeiten sind mit weniger als 20% RSD% (vgl. Tab. 5.7.2.2.1; Kap. 9.7) deutlich geringer als bei den Versuchen, bei denen ein 50 mM Puffer verwendet wird. Diese Beobachtung zeigt, daß Myoglobin durch ionische Wechselwirkungen an der Kapillarwand adsorbiert wird. Die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität ist weniger ausgeprägt als bei den Versuchen in Kap. 5.7.1.2, was darauf zurückzuführen ist, daß die Kapillaroberfläche weniger dicht mit Myoglobin belegt wird. Möglicherweise wird die Tertiärstruktur durch die höhere Acetat-Konzentration stabilisiert, so daß die native Proteinstruktur nicht vollständig verloren geht. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die pro Lauf injizierte Menge Myoglobin niedriger ist als bei den vorausgegangenen Versuchsreihen.

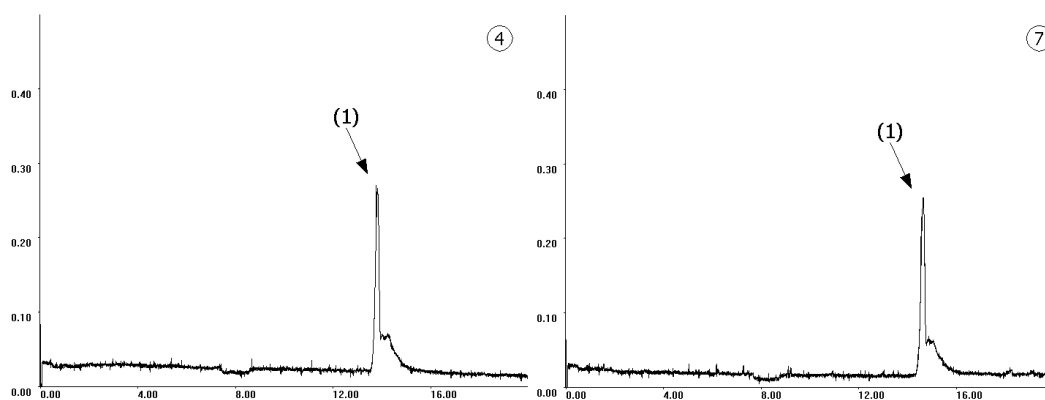


Abbildung 5.92: SDS (~ 400 ng pro Injektion; MYOA-240102)

Acetat-Puffer pH 5,3 100 mmol·l<sup>-1</sup>, 200 mmol·l<sup>-1</sup> SDS, U=15 kV, I ~ 70 µA; v.l.n.r. Läufe 4 u. 7

Im Anschluß an die Untersuchung von Myoglobin wird anstelle der Proteinlösung eine SDS-haltige Lösung injiziert, um zu prüfen, ob sich auch unter diesen Versuchsbedingungen das Protein desorbieren läßt. Im Vergleich zu den Versuchen bei pH 5,0 (s. Kap. 5.7.2.1) wird die Spannung von 30 kV auf 15 kV reduziert, um einen ruhigeren Verlauf der Basislinie zu erreichen. Die Elektropherogramme in Abb. 5.92 zeigen, daß sich Myoglobin durch den Einsatz von anionischen Tensiden auswaschen läßt.

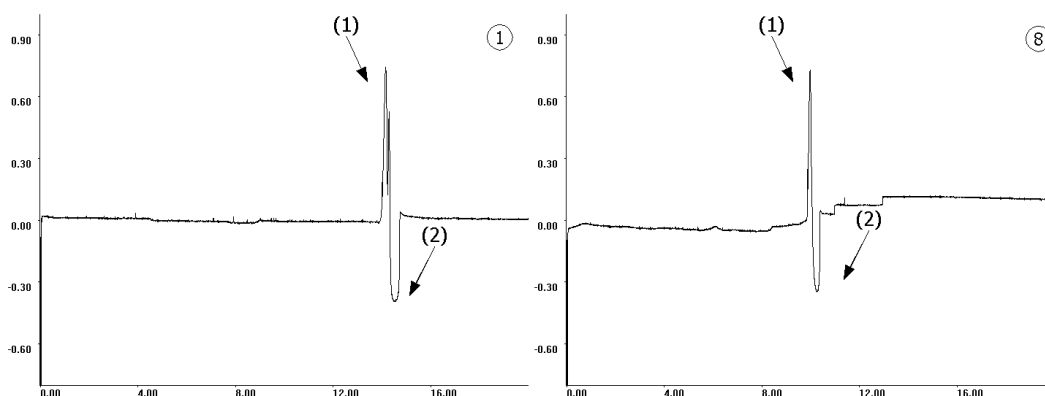


Abbildung 5.93: SDS + Isopropanol (~ 200 ng SDS in 50% Isopro. pro Injektion; MYOA-240102)



Zusätzlich wird eine zweite, tensidhaltige Lösung verwendet, in der 100 mM SDS und 50% (V/V) Isopropanol enthalten sind. Die in Abb. 5.93 gezeigten Elektropherogramme aus den Untersuchungen zeigen, daß deutlich höhere Peaks resultieren. Eine genaue Quantifizierung des Proteinpeaks (1) ist nicht möglich, da der direkt nachfolgend Isopropanol-Peak (2) zu Schwierigkeiten bei der Integration führt.

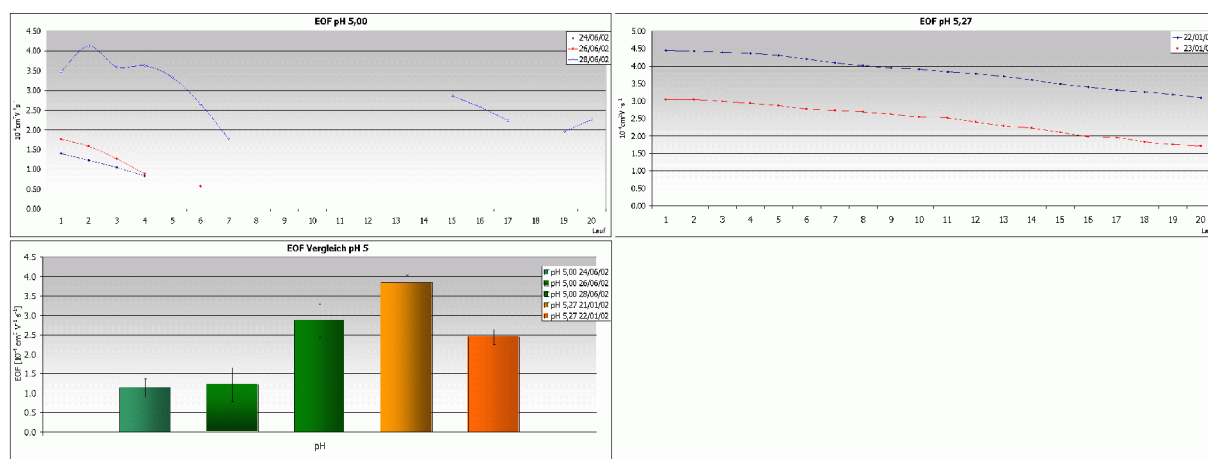


Abbildung 5.94: EOF bei pH 5,0 und 5,3; 100 mM Acetat-Puffer

Die durchgeführten Versuche bei pH 5,0 bzw. 5,3 unter Verwendung 100 mM Puffersysteme zeigen, daß bei entsprechender Anpassung der Feldstärke an die höhere Pufferkonzentration besser reproduzierbarere Ergebnisse erzielen lassen. Die Verbesserungen, die durch den taxigenen Effekt der Acetat-Ionen erreicht werden, führen aber noch nicht dazu, daß sich Myoglobin erfassen läßt. Vielmehr bleibt festzustellen, daß die ionischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Kapillaroberfläche die Hauptursache für die adsorptionsbedingten Schwierigkeiten darstellen. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, daß durch SDS-haltige Lösungen Proteinadsorbate ausgewaschen werden können.

### 5.7.2.3 Untersuchungen bei pH 6,4 – Desorption mit SDS

Die in Kap. 5.7.1.4 präsentierten Ergebnisse belegen, daß sich Myoglobin auch unterhalb des IP kapillarzonenelektrophoretisch bestimmt läßt. Die Resultate zeigen gleichzeitig aber auch, daß aufgrund der relativen Veränderungen der Migrationszeiten von Acetanilid und Myoglobin zueinander, eine Adsorption des makromolekularen Analyten nicht auszuschließen ist. Geht man davon aus, daß eine bestimmte Anzahl von Läufen notwendig ist, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption von Myoglobin einstellt, kann das nur in einer Versuchsreihe mit mehr als 30 Messungen untersucht werden. Darüber hinaus läßt sich unter diesen Bedingungen bes-

ser klären als bei  $\beta$ -Lactoglobulin, ob die Sterilfiltration Einfluß auf Reproduzierbarkeit hat. Da Proteine in der Nähe des IP zur Bildung von Clustern und Assoziaten neigen, ist der Einfluß des Filtrationsschrittes in diesem pH-Bereich potentiell am größten. Im Gegensatz zu  $\beta$ -Lactoglobulin sind bei Myoglobin keine gravierenden Probleme mit der Tertiärstruktur bei pH 6,4 zu erwarten.

Aufgrund der Hysteresis des EOF bei pH 6,0-6,5 wird zu Beginn der Untersuchungen die Systempräzision bestimmt. Die Ergebnisse des EOF-Markers zeigen, daß sich das CE-System in einem stabilen Gleichgewichtszustand befindet (S. Tab. 5.7.2.3.1).

Systempräzision 1	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	2,474	2,461	2,486	0,031	1,250	0,00096
Fläche [AU·min]	Acetanilid	8,364	8,321	8,408	0,111	1,327	0,01232
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	3,382	3,365	3,398	0,043	1,265	0,00183
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,872	6,838	6,905	0,085	1,240	0,00726

Tabelle 5.7.2.3.1: Systempräzision, pH 6,4 EOF-Marker (Serie MYOA-060802)

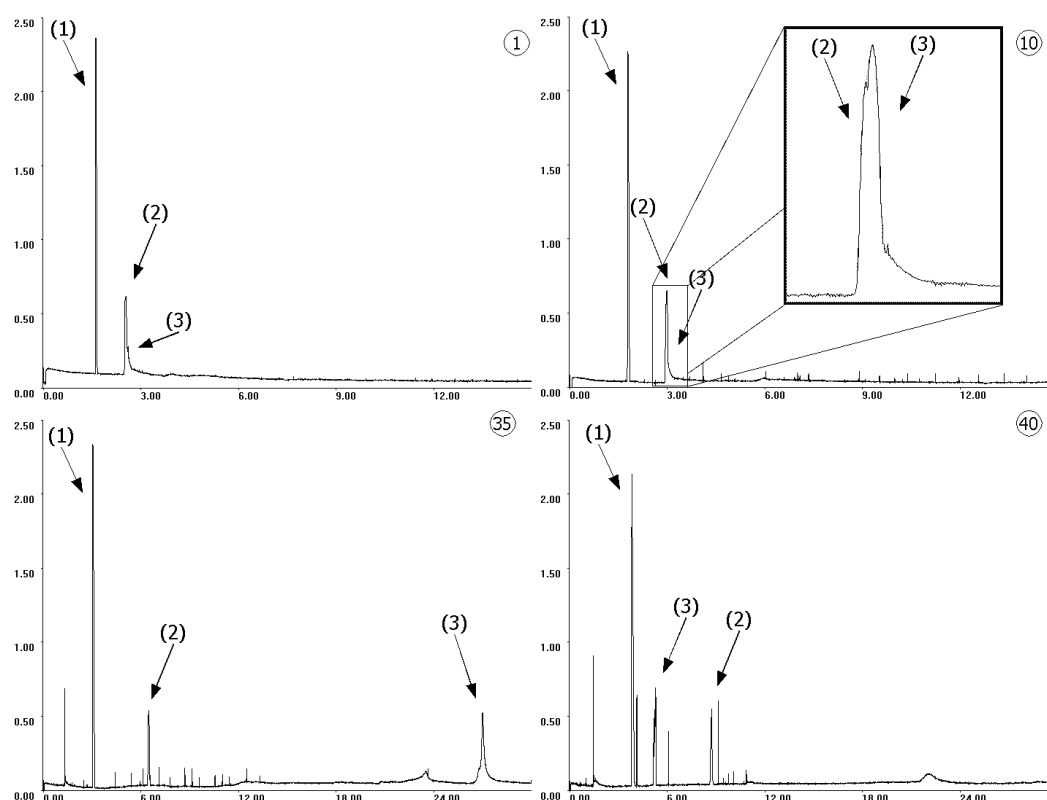


Abbildung 5.95: Myoglobin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; MYOA-060802)  
Phosphat-Puffer pH 6,4 59  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=28$  kV,  $I \sim 64$   $\mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 35, 40  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Die Elektropherogramme der Meßreihe zeigen (Abb. 5.95), daß sich die Peaks von Acetanilid (2) und Myoglobin (3) überlagern. Bedingt durch die kürzeren Migrationszeiten läßt sich nur ein Peakmaximum erkennen, allerdings belegen die Werte für AU und korr. AU, daß sich zwei Substanzen hinter dem Signal verbergen.

Bei der Auswertung fällt zunächst auf, daß die Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid deutlich zunehmen im Vergleich zu den Untersuchungen in Kap. 5.7.1.4. Außerdem treten bereits nach etwa 10 Läufen vermehrt Spikes in der UV-Spur der Elektropherogramme auf, die ein Hinweis für das Auftreten von kleineren Partikeln bzw. Abbauprodukten des Myoglobins sind. In den Läufen 34 und 35 treten zusätzliche Proteinpeaks auf, welche vermutlich auf die Bildung von Assoziaten zurückzuführen sind. In den darauf folgenden Läufen beobachtet man einen deutlichen Abfall der korrigierten Flächen des EOF-Markers, was darauf hinweist, sich das Migrationsverhalten des Proteins deutlich verändert. Da außerdem ein Proteinpeak zwischen Neostigmin und Acetanilid auftritt (s. Abb. 5.95, Lauf 40), dessen Migrationszeiten gegen den allgemeinen Trend abnehmen (vgl. Abb. 5.96) muß man davon ausgehen, daß nur noch Abbauprodukte des Myoglobins vorliegen.

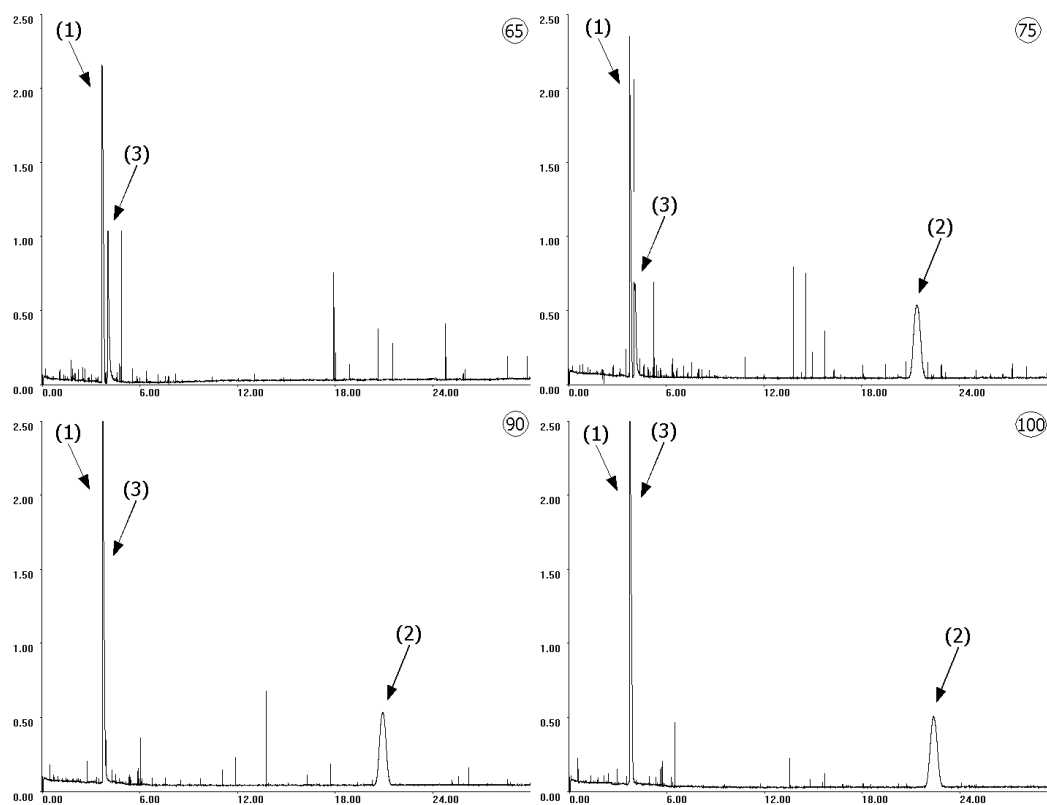


Abbildung 5.96: Myoglobin ( $\sim 7$  ng pro Injektion; MYOA-060802)  
Phosphat-Puffer pH 6,4  $59 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=28 \text{ kV}$ ,  $I \sim 64 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 65, 75, 90, 100  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Wenn man annimmt, daß im N-terminalen Bereich ein Kettenbruch erfolgt, würde das resultierende Hauptfragment einen IP von deutlich über 8,5 besitzen. Die deutlich größere Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zum nativen Protein ließe sich dadurch erklären. Ab dem 80. Lauf beobachtet man eine signifikante Zunahme der

korr. AU-Werte von Neostigmin, so daß es zu Überschneidungen von internem Standard und Abbauprodukten des Myoglobins kommt. Darüber hinaus stabilisieren sich die Migrationszeiten von Neostigmin und Acetanilid ab etwa dem 70. Lauf.

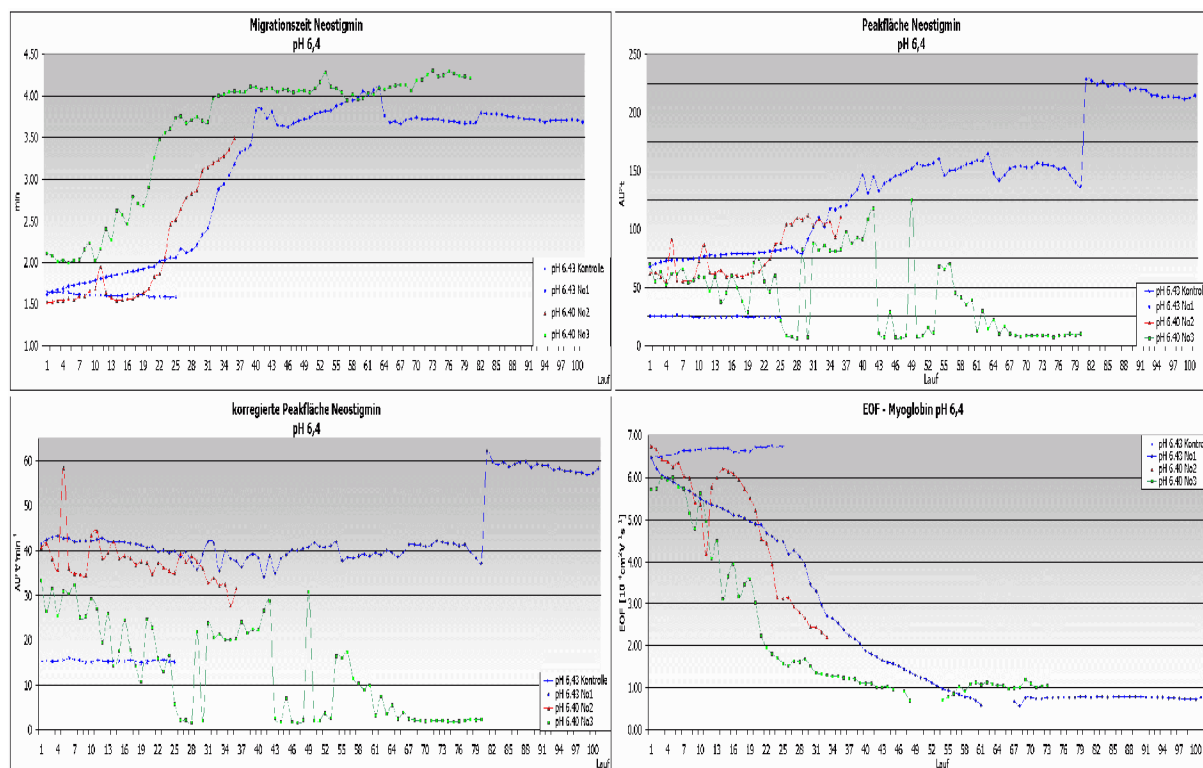


Abbildung 5.97: Myoglobin pH 6,4; Ergebnisse interner Neostigmin

Ähnliche Beobachtungen werden auch in zwei weiteren Meßreihen gemacht, wobei sich die Einbrüche der Migrationszeiten nur ungefähr reproduzieren lassen (vgl. Abb. 5.97). Man beobachtet allerdings in den durchgeführten Meßreihen Unterschiede bei der Peakform und im Migrationsverhalten von Myoglobin. Das weist darauf hin, daß in nicht sterilfiltrierter Probenlösung verschiedene Abbauprozesse des Proteins ablaufen. Die Versuche bleiben erfolglos, im Anschluß Myoglobin mit SDS-haltigem Puffer zu desorbieren. Das weist darauf hin, daß das Protein durch Alterungsprozesse in seinen Desorptionseigenschaften stark verändert wird und daß die Denaturierung des Proteins nicht mit der Adsorption an der Kapillarwand abgeschlossen ist. Die Untersuchungen zeigen auch, daß der taxigene Einfluß von Phosphat-Ionen unter den Versuchsbedingungen keinen nennenswerten Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hat.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind für Acetanilid und Myoglobin in den Tabellen 5.7.2.3.2 und 5.7.2.3.3 zusammengefaßt, wobei sich aufgrund der immensen Abweichungen keine signifikanten Unterschiede ausmachen lassen. In der Meß-

reihe MYOA-260802 läßt sich Myoglobin gar nicht quantifizieren, da zu viele Peaks registriert werden, die sich nicht zuordnen lassen. Die ursprüngliche Annahme hat sich nicht bestätigt, daß sich zwischen Adsorption und Desorption ein Gleichgewicht einstellt. Bedingt durch die Zersetzung des Proteins nähern sich die AU- bzw. korr. AU-Werte auch nach einer bestimmten Zeit keinem konstanten Wert an.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-060802							
t <sub>Mig</sub>	[min]	12,831	11,163	14,498	8,291	64,621	68,74709
Fläche	[AU·min]	87,306	75,729	98,883	57,572	65,942	3314,48639
korr. Fläche	[AU]	7,630	7,015	8,244	3,055	40,039	9,33233
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	2,500	2,091	2,909	2,032	81,285	4,12950
MYOA-210802							
t <sub>Mig</sub>	[min]	3,994	3,435	4,552	1,637	40,986	2,67914
Fläche	[AU·min]	23,348	20,484	26,213	8,396	35,960	70,49405
korr. Fläche	[AU]	6,840	5,468	8,212	4,021	58,796	16,17182
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	5,242	4,666	5,818	1,689	32,220	2,85252
MYOA-260802							
t <sub>Mig</sub>	[min]	13,086	11,486	14,686	6,683	51,072	44,66740
Fläche	[AU·min]	42,804	27,560	58,048	63,663	148,730	4052,91518
korr. Fläche	[AU]	5,091	2,194	7,989	12,101	237,674	146,42716
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	2,251	1,837	2,665	1,729	76,794	2,98815

Tabelle 5.7.2.3.2: pH 6,4 EOF-Marker

Vergleicht man die Meßreihen, die im pH-Bereich zwischen 6,0 und 6,5 durchgeführt werden, zeigt sich, daß die Reproduzierbarkeit durch den Filtrationsschritt günstig beeinflusst wird. Die Ergebnisse in Kap. 5.7.1.3 belegen, daß sich durch die Beseitigung von partikulären Bestandteilen >0,22 µm der Zeitpunkt verzögern läßt, bei dem die Adsorptionsprozesse auftreten. Die Ursache der elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Kapillaroberfläche bei einem bestimmten pH-Wert bleibt davon unberührt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision							
t <sub>Mig</sub>	[min]	6,497	2,748	10,246	7,652	117,764	58,54557
Fläche	[AU·min]	62,933	52,929	72,937	20,417	32,442	416,84811
korr. Fläche	[AU]	14,175	11,505	16,845	5,450	38,448	29,70219
Experiment							
t <sub>Mig</sub>	[min]	2,737	2,670	2,803	0,090	3,281	0,00806
Fläche	[AU·min]	8,176	4,921	11,430	4,394	53,745	19,30643
korr. Fläche	[AU]	2,994	1,817	4,170	1,588	53,046	2,52173
MYOA-260802							
Keine integrierbaren Peaks	Myoglobin						

Tabelle 5.7.2.3.3: Myoglobin, pH 6,4

### 5.7.2.4 Untersuchungen bei pH 7,0 – Ionenstärke

Die Versuchsreihen bei pH 6,4 zeigen, daß sich bei der Proteinadsorption offensichtlich kein dynamisches Gleichgewicht an der Kieselglasoberfläche einstellt. Daher soll in weiteren Versuchen geklärt werden, ob durch eine deutliche Erhöhung der Ionenstärke bei pH 7,0 die Wechselwirkungen zwischen dem makromolekularen Analyten und der Kapillare reduziert werden können. Die Idee, die den Untersuchungen zu Grunde liegt, besteht darin, das  $\zeta$ -Potential durch die Pufferkationen deutlich zu reduzieren, so daß die negativ geladene Grenzfläche besser elektrostatisch abgeschirmt wird. Um gleichzeitig die Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate von Myoglobin deutlicher erfassen zu können, wird die pro Lauf injizierte Proteinmenge auf 840 pg reduziert. Geht man davon aus, daß pro Lauf eine konstante Menge Myoglobin adsorbiert wird, lassen sich Veränderungen bei den korrig. AU-Werten leichter erkennen.

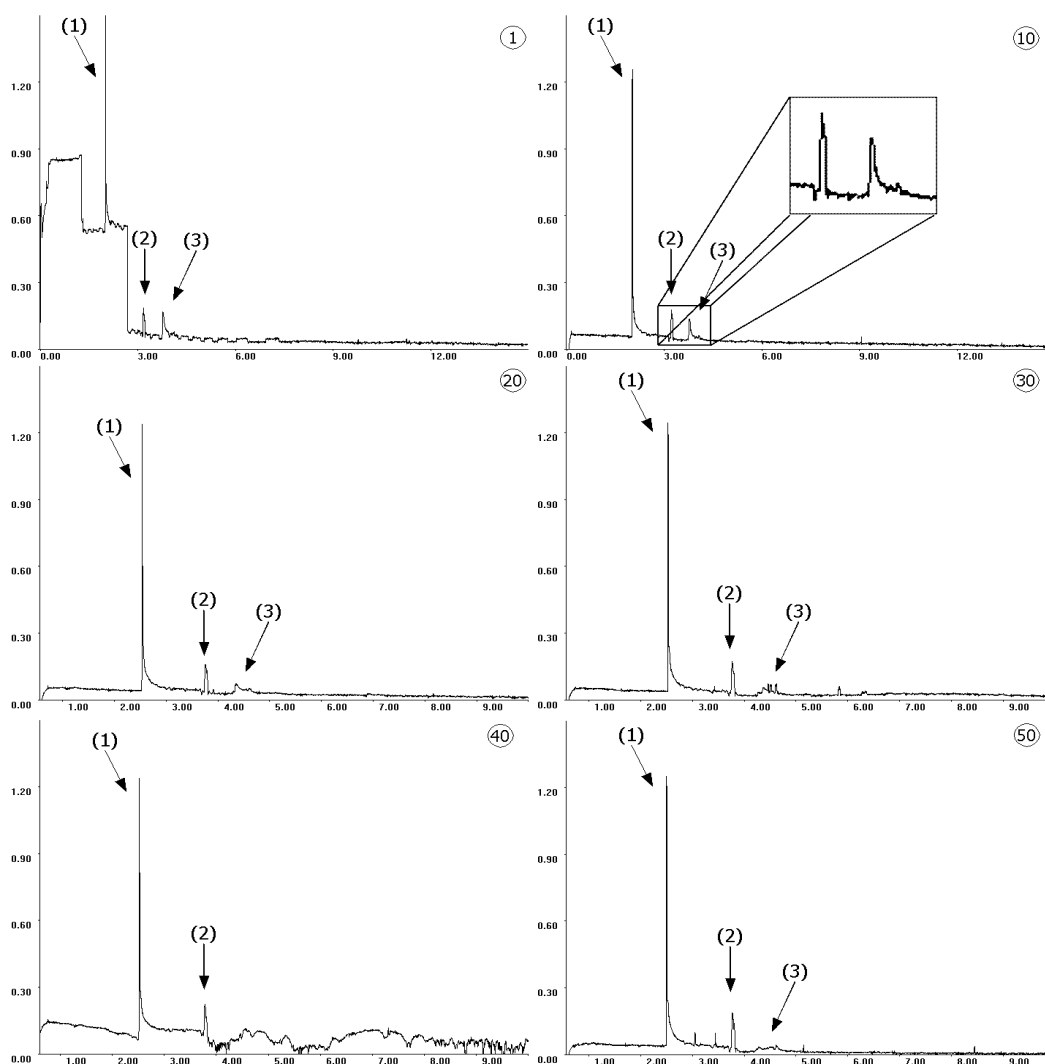


Abbildung 5.98: Myoglobin ( $\sim 1$  ng pro Injektion; MYOG-130502)  
Phosphat-Puffer pH 7,0  $134 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=22 \text{ kV}$ ,  $I \sim 190 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30, 40, 50  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

In Abb. 5.98 sind einige der Elektropherogramme aus der 50 Messungen umfassenden Meßreihe dargestellt. Zunächst fällt auf, daß im Unterschied zu den Ergebnissen in Kap. 5.7.1.5 insgesamt drei Peaks beobachtet werden. Während der Neostigmin-Peak (1) keine Besonderheiten aufweist, handelt es sich bei Peak 2 um die sich überlagernden Signale von Acetanilid und Myoglobin, wie sie bereits in der Meßreihe MYO-281004 beobachtet worden sind. Zusätzlich erkennt man einen weiteren Peak (3), dessen Nettomobilität anodisch gerichtet zu sein scheint. Dieser ist bei den vorausgegangenen Untersuchungen nicht in dieser Form beobachtet worden. Es sind mehrere Erklärungen für diese Beobachtung denkbar. Bei CIEF-Untersuchungen des Proteins sind eine Haupt- und eine Nebenfraktion beobachtet worden (vgl. Abb. 4.4), die sich in Bezug auf den IP unterscheiden. Während die Hauptkomponente bei einem pH-Wert von 7,4 elektrisch neutral reagiert, liegt der IP der Nebenkomponente bei 7,0. Allerdings sind beide Proteinformen bei den Messungen in der Versuchsreihe MYO-281004 nicht so deutlich voneinander getrennt worden und zeigen dort ein vollkommen anderes Peakmuster. Weiterhin ist der Einfluß der Elektrolytlösung zu berücksichtigen, da bei einer Spannung von 22 kV und einer Stromstärke von ca. 190  $\mu\text{A}$  davon ausgegangen werden muß, daß die Tertiärstruktur durch thermische Einflüsse verändert wird.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-130502							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,202	3,189	3,215	0,046	1,435	0,00211
Fläche [AU·min]	Acetanilid	5,981	5,698	6,264	1,000	16,714	0,99926
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	1,861	1,776	1,945	0,299	16,064	0,08932
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	6,541	6,514	6,568	0,097	1,484	0,00942
MYOA-160502							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	2.562	2.476	2.647	0.180	7.020	0.03234
Fläche [AU·min]	Acetanilid	2.249	2.033	2.465	0.454	20.195	0.20633
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0.889	0.794	0.985	0.202	22.666	0.04063
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	8.236	7.983	8.488	0.531	6.447	0.28194

Tabelle 5.7.2.4.1: pH 7,0 EOF-Marker

Die statistische Auswertung zeigt, daß die Migrationszeiten bei allen Analyten maximal um maximal 2,34% RSD% schwanken (Neostigmin), was gegen Adsorptionsprozesse und eine unkontrollierte Wärmeentwicklung spricht.

Die vergleichsweise hohe elektroosmotische Mobilität von  $6,54 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (50 mM Puffer:  $5,43 \cdot 10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ist allerdings auf die höhere Temperatur in der Kapillare und damit geringere Viskosität der Lösung zurückzuführen. Die Meßwerte für die Pe-

akflächen unterliegen deutlichen Schwankungen (s. Tab. 5.7.2.4.1 und 5.7.2.4.2), die allerdings auf das schlechte Signal-/Rausch-Verhältnis und damit auf die Integration zurückzuführen sind. Im Anschluß wird eine zweite Meßreihe (MYOA-160502) durchgeführt. Die angelegte Spannung kann auf 25 kV erhöht werden, da gleichzeitig die Pufferkonzentration auf 67 mM reduziert und dadurch der Entwicklung von Joulescher Wärme entgegengewirkt wird. Die Untersuchungen zeigen ein ähnliches Bild wie in Abb. 5.98, allerdings entspricht das Peakmuster von Myoglobin demjenigen, daß beispielsweise auch bei pH 9,2 (s. Kap. 5.7.1.8) beobachtet wird. Es lassen sich allerdings keine Überschneidungen mit dem EOF-Marker-Peak beobachten.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-130502							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	3,772	3,749	3,794	0,064	1,700	0,00411
Fläche [AU·min]	Myoglobin	3,421	2,807	4,036	1,745	51,014	3,04609
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	0,910	0,746	1,074	0,466	51,247	0,22000
MYOA-160502							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	2.691	2.606	2.776	0.180	6.673	0.03224
Fläche [AU·min]	Myoglobin	4.737	4.186	5.287	1.158	24.452	1.34152
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	1.783	1.560	2.007	0.470	26.360	0.22092

Tabelle 5.7.2.4.2: Myoglobin, pH 7,0

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Peakflächen und korrigierten Peakflächen besser reproduzieren lassen, allerdings streuen die Migrationszeiten deutlich stärker. Die Zunahme der RSD%-Werte von  $t_{\text{Mig}}$  im Vergleich zu den Untersuchungen in 50 und 134 mM Puffer weist auf die Adsorption von Myoglobin unter den Bedingungen der Meßreihe MYOA-160502 hin. Bestätigt wird die Annahme dadurch, daß die Peaks von Acetanilid und Myoglobin Basislinien getrennt sind, da obwohl beide Analyten unter den Versuchsbedingungen ungeladen vorliegen. Die kleinere effektive Mobilität des Proteins läßt durch die reversible Adsorption an der Kapillarwand erklären. Da die Proteinlösung vor Gebrauch nicht sterilfiltriert wird, deutet alles darauf hin, daß größere Proteinassoziate, die sonst zurückgehalten oder zerstört werden, den Auslöser für die Adsorptionsprozesse darstellen.

### 5.7.2.5 Untersuchungen bei pH 9,2 – Desorption mit SDS

Um zu überprüfen, ob das Filtrieren der Probenlösung bei Myoglobin auch in alkalischer Lösung Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit hat, wird eine weitere Versuchsreihe bei pH 9,2 durchgeführt, bei der ein 100 mM Borat-Puffer benutzt wird. Die Trennung der Substanzen wird bei einer Spannung von 28 kV durchgeführt.



Die in Abb. 5.99 zusammengestellten Elektropherogramme verdeutlichen die auftretenden Probleme bei der Meßreihe MYOA-100502. Mit Ausnahme des zweiten Laufes sind die Migrationszeiten von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und Myoglobin (3) während der Untersuchung konstant und zeigen nur geringe Schwankungen.

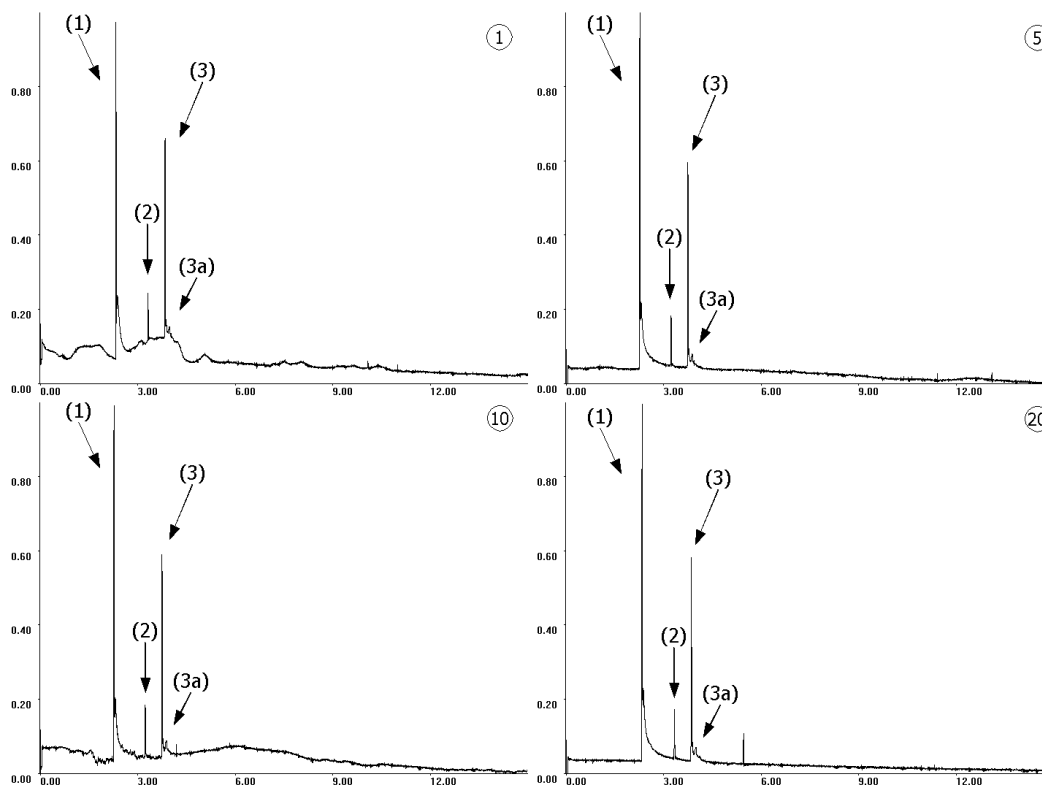


Abbildung 5.99: Myoglobin ( $\sim 1$  ng pro Injektion; MYOG-100502)  
Borat-Puffer pH 9,2  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=28 \text{ kV}$ ,  $I \sim 39 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 20  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Allerdings fallen die ungewöhnlichen Basislinienschwankungen auf, die zu Problemen bei der Integration führen wie im ersten Lauf. In den Tabellen. 5.7.2.5.1 und 5.7.2.5.2 sind die Ergebnisse für die gesamte Meßreihe zusammengefaßt, aber auch die Werte, die sich nach der Elimination des zweiten Laufes ergeben. Die Schwankungen, die bei den Vergleichssubstanzen gemessen werden, bewegen sich im Rahmen, der auch in anderen Meßreihen bei pH 9,2 beobachtet wird.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\overline{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
n = 20							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	3,582	2,962	4,202	1,414	39,470	1,99888
Fläche [AU·min]	Acetanilid	1,956	1,108	2,804	1,935	98,940	3,74590
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,496	0,437	0,556	0,135	27,247	0,01829
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,475	5,107	5,843	0,839	15,324	0,70392
n = 19							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	3,266	3,243	3,289	0,051	1,547	0,00255
Fläche [AU·min]	Acetanilid	1,524	1,488	1,559	0,079	5,154	0,00617
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,467	0,455	0,478	0,025	5,453	0,00065
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,662	5,622	5,701	0,087	1,542	0,00762

Tabelle 5.7.2.5.1: pH 9,2 EOF-Marker 48 µm I.D.; Serie MYOA-100502 ( o. n=20; u. n=19, s. Text)

Im Gegensatz dazu streuen die Werte des Proteins deutlich stärker, als sich durch Integrationsfehler begründet läßt. Daher wird im Anschluß durch die Injektion einer 200 mM SDS-Pufferlösung geprüft, ob sich eine Proteinplaque auf der Kapillaroberfläche gebildet hat, die sich durch Tenside desorbieren läßt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$	
n = 20								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Myoglobin	4,266	3,315	5,217	2,170	50,867	4,70916
Fläche	[AU·min]	Myoglobin	11,490	9,415	13,566	4,736	41,216	22,42834
korr. Fläche	[AU]	Myoglobin	2,742	2,615	2,870	0,291	10,608	0,08461
n = 19								
t <sub>Mig</sub>	[min]	Myoglobin	4,266	3,315	5,217	2,170	50,867	4,70916
Fläche	[AU·min]	Myoglobin	11,490	9,415	13,566	4,736	41,216	22,42834
korr. Fläche	[AU]	Myoglobin	2,742	2,615	2,870	0,291	10,608	0,08461

Tabelle 5.7.2.5.2: Myoglobin, pH 9,2 48 µm I.D.; Serie MYOA-100502 ( o. n=20; u. n=19, s. Text)

Die in Abb. 5.100 gezeigten Elektropherogramme zeigen, daß sich entsprechende Tensid-Micellen gebildet haben, welche adsorbierte Substanzen zum Detektor transportieren. Da bei den Untersuchungen mit normaler Polung gearbeitet wird, verwundern die beobachteten Peaks (1). Sowohl Myoglobin als auch das Tensid sind bei einem pH-Wert von 9,2 negativ geladen, weshalb die resultierenden Assoziate multivalente Anionen darstellen, deren elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  entgegengesetzt gerichtet ist zum EOF. Bei den Untersuchungen wird eine Spannung von 30 kV angelegt, so daß die elektroosmotische Geschwindigkeit ausreicht, um anionische Substanzen in Richtung des Detektors zu transportieren.

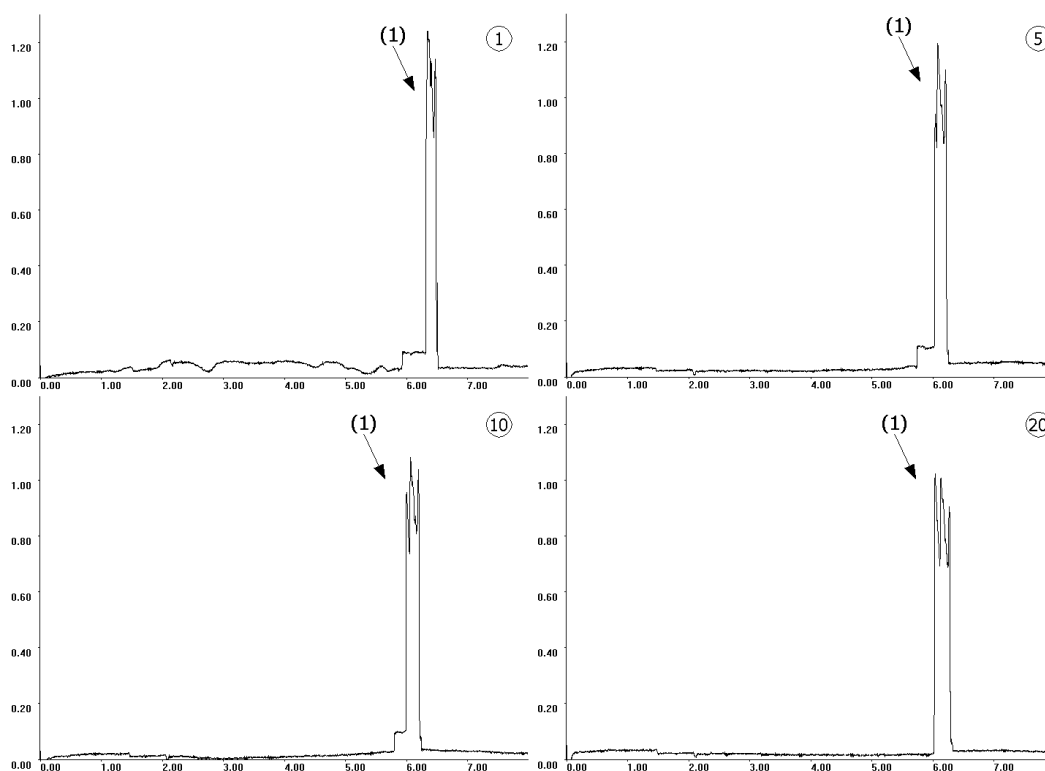


Abbildung 5.100: SDS ( $\sim 120$  ng pro Injektion; MYOG-100502)  
 Borat-Puffer pH 9,2  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=30 \text{ kV}$ ,  $I \sim 45 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 20

Nimmt man an, daß zwischen Kapillaroberfläche und Protein nur schwache Kräfte wirken, reicht bereits die Anlagerung von wenigen SDS-Molekülen aus, um die Anziehungskräfte zu überwinden. Die pro Lauf injizierte SDS-Menge beträgt etwa 840 fmol, während bei der gesamten vorausgegangenen Meßreihe insgesamt nur 1,2 pmol Myoglobin untersucht worden sind. Daher liegt bei jeder Injektion ein deutlicher SDS-Überschuss vor. Die Ergebnisse sind so zu interpretieren, daß nur ein Teil des Tensids Komplexe mit Myoglobin eingeht, diese aber durchaus ein SDS-Protein-Verhältnis von 50:1 oder höher aufweisen können. Die effektive Mobilität, welche durch das Ladungs-Größenverhältnis des Komplexes bestimmt wird, ist kleiner als die elektroosmotische Mobilität des CE-Systems. Die beobachteten Migrationszeiten von ca. 6 min sind insofern verwunderlich, da bei negativ geladenen Teilchen mit höherer Ladungsdichte meist längere Migrationszeiten beobachtet werden.

Bei genauer Betrachtung der Elektropherogramme fällt auf, daß es sich bei dem Peak (1) um mehrere, unterschiedliche Fraktionen handelt, die nur ansatzweise getrennt werden. Dabei handelt es sich vermutlich um verschiedene Konformere des Myoglobins, da durch den Einfluß von SDS Veränderungen bis auf die Ebene der Sekundärstruktur ausgelöst werden [139]. Die Verwendung von internen Standards ist unter

diesen Bedingungen aber nur bedingt möglich, da Neostigmin als quartäre Ammoniumverbindung Ionenpaare mit SDS bildet.

### **5.7.2.6 Untersuchungen bei pH 8,4 und 9,2 – Innendurchmesser**

Ein Aspekt, der für die Reproduzierbarkeit bei Proteinuntersuchungen von Interesse ist und auf den ebenfalls eingegangen werden soll, ist der Innendurchmesser der Kapillaren. Das Verhältnis von Oberfläche und Volumen eines Segmentes ist eine Funktion des Radius und nimmt mit zunehmendem Durchmesser ab.

Kapillaren mit niedrigem Innendurchmesser haben den Vorteil, daß durch die geringe Querschnittsfläche bei konstanter Spannung und Pufferzusammensetzung ein geringerer Stromfluß resultiert als in weitlumigen Varianten. Daher treten in der Kapillare geringere Temperaturgradienten und damit verbundene Konvektionsströme auf. Dies ist insofern vorteilhaft, da thermischer Streß zur Denaturierung von Proteinen führt. Dem gegenüber steht der Nachteil, daß durch den geringeren Durchmesser die Empfindlichkeit des UV-Detektors bei gleicher Probenkonzentration abnimmt und folglich die Nachweis- und Bestimmungsgrenze höher liegen. Eine Kompensation durch größere Analytenmengen ist nicht empfehlenswert, da dies zu Peakverbreiterungen und schlechterer Trennleistung führt.

Kapillaren mit einem Innendurchmesser von etwa 80-100 µm haben den Vorteil, daß durch den größeren Radius das Ansprechverhalten des UV-Detektors deutlich günstiger ist. Dem gegenüber stehen einige Nachteile. Insbesondere die freigesetzte Wärme macht es notwendig, Puffer mit einer geringen spezifischen Leitfähigkeit zu verwenden oder die Feldstärke entsprechend abzusenken. Um mögliche Auswirkungen auf die zonenelektrophoretische Analytik von Proteinen untersuchen zu können, werden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen Kapillaren mit I.D. von 27 µm respektive 79 µm verwendet werden. Die Untersuchungen werden unter unkritischen, alkalischen Bedingungen durchgeführt, wobei entweder ein 100 mM Borat-Puffer, pH 9,2, oder ein 120 mM Borat-Puffer, pH 8,4, verwendet wird. Die resultierenden Elektropherogramme sind in den Abb. 5.101 und 5.102 dargestellt.

Die Messungen, die in englumigen Kapillaren durchgeführt werden, zeigen, daß zum einen Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit des Peakmusters durch den Verlauf der Basislinie verursacht werden. Zum anderen wird deutlich, daß die Peaks von Neostigmin (1), Acetanilid (2) und Myoglobin (3) durch Dispersionseffekte ein deutliches

Tailing zeigen und daß die injizierte Probenmenge nicht weiter erhöht werden kann. Die pro Lauf analysierte Proteinmenge beträgt mit etwa 0,5 ng (vgl. Kap. 9.7.7/.16)

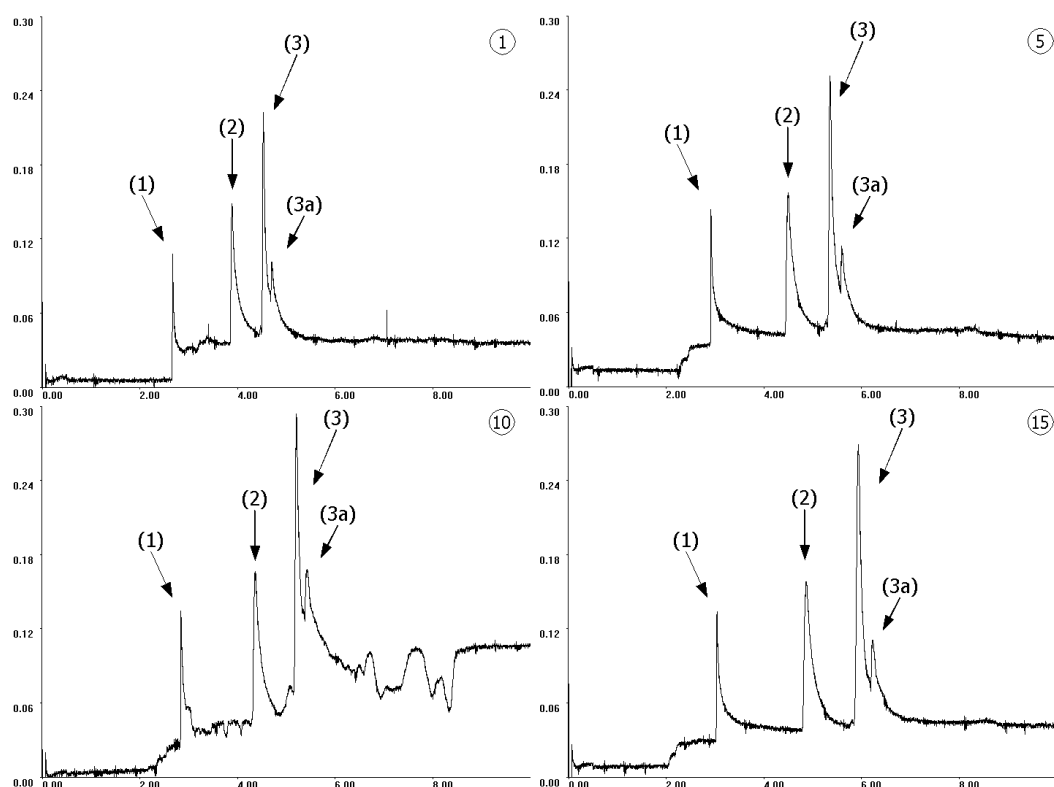


Abbildung 5.101: Myoglobin ( $\sim 0,5$  ng pro Injektion; MYOG-120901)  
I.D. = 27  $\mu\text{m}$ , Borat-Puffer pH 9,2 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $U=25$  kV,  $I \sim 22$   $\mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

nur etwa 10% der sonst üblichen Menge Myoglobin. Größere Injektionsvolumina führen dazu, daß die Substanzpeaks überlappen. Darüber hinaus bewegt sich die Absorption mit maximal 0,3 mAU an der unteren Grenze, bei der apparative Einflüsse wie Rauschen der Lichtquelle, Lichtbrechung und -beugung im Strahlengang und die Fokussierung des Probenstrahls noch keine nennenswerte Fehlerquelle darstellen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-120901							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,656	3,626	3,686	0,060	1,632	0,00356
Fläche [AU·min]	Acetanilid	10,033	9,660	10,406	0,737	7,344	0,54282
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	2,744	2,648	2,840	0,190	6,914	0,03598
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,815	4,776	4,854	0,077	1,599	0,00593
MYOA- 130901							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,383	4,208	4,558	0,345	7,882	0,11936
Fläche [AU·min]	Acetanilid	13,584	12,643	14,524	1,859	13,683	3,45464
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	3,088	2,972	3,205	0,230	7,441	0,05280
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,130	3,968	4,292	0,320	7,741	0,10221

Tabelle 5.7.2.6.1: pH 9,2 EOF-Marker 27  $\mu\text{m}$  I.D.

Die in Tab. 5.7.2.6.1 und 5.7.2.6.2 erhaltenen Resultate zeigen, daß unter unkritischen Bedingungen bereits relativ große Abweichungen bei den Flächen und korri-

gierten Flächen auftreten, während die Migrationszeiten sich in der ersten Meßreihe gut reproduzieren lassen. Bei der Wiederholung der Meßreihe treten dann auch bei den Migrationszeiten aller Analyten erheblich größere Schwankungen auf. Da im Vergleich zu den Experimenten in 50 µm Kapillaren keine Verbesserungen durch die geringere Querschnittsfläche und damit geringere Stromstärke zu erwarten sind, werden keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-120901							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	4,289	4,250	4,327	0,076	1,774	0,00579
Fläche [AU·min]	Myoglobin	15,402	14,693	16,111	1,400	9,091	1,96039
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	3,594	3,420	3,767	0,343	9,544	0,11762
MYOA-130901							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	5,226	4,974	5,479	0,499	9,549	0,24904
Fläche [AU·min]	Myoglobin	22,536	20,196	24,875	4,623	20,515	21,37349
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	4,285	3,960	4,610	0,642	14,982	0,41213

Tabelle 5.7.2.6.2: Myoglobin, pH 9,2 27 µm I.D.

In Abb. 5.102 sind einige Elektropherogramme abgebildet, die bei der Bestimmung von Myoglobin bei pH 8,4 in Kapillaren mit 79 µm I.D. aufgenommen worden sind. Das Peakmuster zeigt eine gute Reproduzierbarkeit, wobei die Schwankungen der Migrationszeiten bei allen Analyten weniger als 0,6% betragen (n=25).

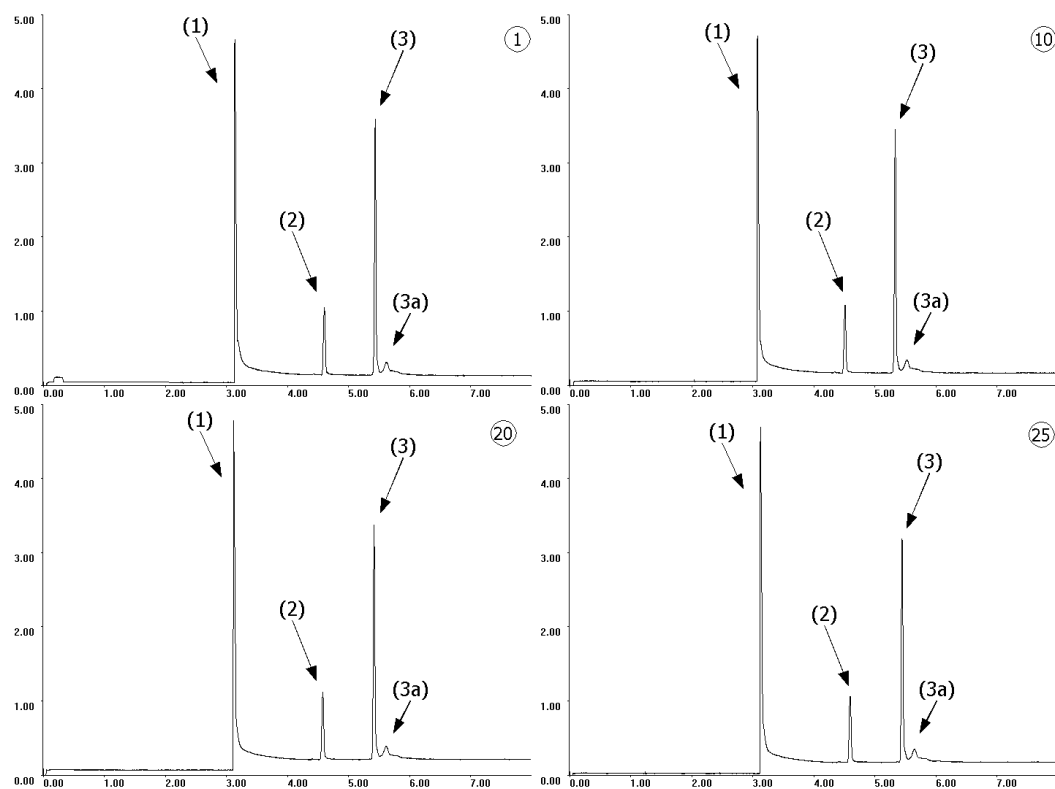


Abbildung 5.102: Myoglobin (~ 5 ng pro Injektion; MYOG-121101)  
I.D. = 79 µm, Borat-Puffer pH 8,4 120 mmol·l<sup>-1</sup>, U=17,5 kV, I ~ 43 µA; Läufe 1, 10, 20, 25  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Myoglobin

Im Vergleich zu den Meßreihen in Kapillaren mit 50 µm I.D. sind die Migrationszeiten länger, da die elektrophoretische Trennung bei einer Spannung von 17,5 kV durchgeführt wird, um die Wärmeentwicklung gering zu halten. Die RSD%-Werte der Flächen und korrigierten Flächen liegen zwischen 1,89 und 2,47% (vgl. Tab. 5.7.2.6.3). Gegenüber den Versuchsreihen in Kapillaren mit 50 µm I.D. ergeben sich keine nennenswerten Vorteile.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-121101							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	4,562	4,553	4,572	0,023	0,510	0,00054
Fläche [AU·min]	Acetanilid	24,616	24,448	24,783	0,419	1,704	0,17594
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	5,396	5,361	5,430	0,087	1,605	0,00750
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,436	5,425	5,447	0,028	0,511	0,00077
MYOA-131101							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	4,684	4,644	4,725	0,077	1,654	0,00600
Fläche [AU·min]	Acetanilid	24,924	24,723	25,125	0,384	1,542	0,14779
korrr. Fläche [AU]	Acetanilid	5,322	5,253	5,391	0,132	2,472	0,01731
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,296	5,249	5,342	0,088	1,666	0,00778

Tabelle 5.7.2.6.3: pH 8,4 EOF-Marker 79 µm I.D.

Die in Abb. 5.102 dokumentierte Trennung der beiden Myoglobin-Fraktionen ist auf die niedrigere Trennungsspannung zurückzuführen und läßt sich auch in Kapillaren mit 50 µm erreichen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
MYOA-121101							
t <sub>Mig</sub> [min]	Myoglobin	5,397	5,385	5,409	0,031	0,571	0,00095
Fläche [AU·min]	Myoglobin	92,834	92,031	93,638	2,008	2,163	4,03168
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	17,200	17,072	17,329	0,321	1,865	0,10293
MYOA-131101							
t <sub>Mig</sub> [min]	Myoglobin	5,527	5,477	5,577	0,095	1,726	0,00910
Fläche [AU·min]	Myoglobin	95,166	94,044	96,287	2,141	2,250	4,58367
korrr. Fläche [AU]	Myoglobin	17,220	17,012	17,427	0,396	2,297	0,15648

Tabelle 5.7.2.6.4: Myoglobin, pH 8,4 79 µm I.D.

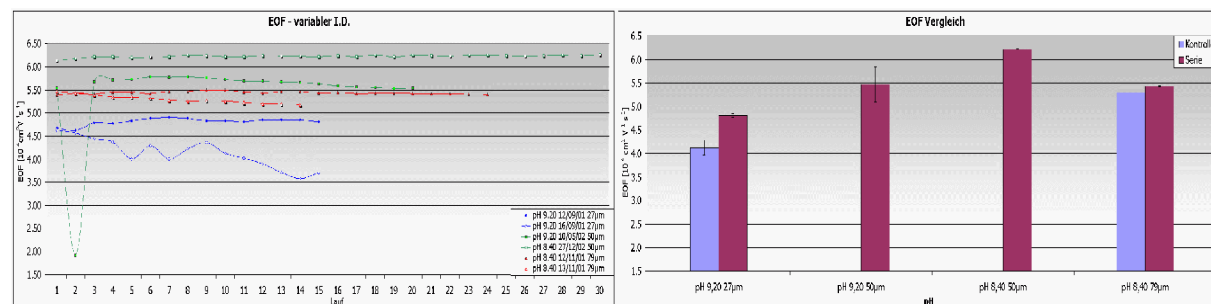


Abbildung 5.103: Vergleich EOF vs. I.D. (Borat-Puffer)

Beim Vergleich der gemessenen elektroosmotischen Mobilitäten lassen sich keine signifikanten Unterschiede ausmachen (s. Abb. 5.103). Die geringfügig kleineren Werte

für Kapillaren mit 27 µm I.D. lassen sich darauf zurückführen, daß die Wärme effizienter abgeführt wird. Für die Kapillaren mit 79 µm I.D. liegt  $\mu_{\text{EOF}} \sim 5,35 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  vergleichsweise niedriger als bei solchen mit 50 µm I.D., was jedoch an geringeren Wärmeentwicklung liegt. Die Untersuchungen zeigen, daß sich der EOF bei allen Meßreihen gut reproduzieren läßt, dies gilt aber nicht für die AU- und korr. AU-Werte der Analyten. Die Versuche in englumigen Kapillaren liefern nicht nur bei Myoglobin, sondern auch bei Neostigmin und Acetanilid schlechter reproduzierbare Werte. Da in den Elektropherogrammen bei allen Peaks ein Tailing zu erkennen ist und sich dieses bei geringen Absorptionswerten stärker auswirkt, handelt es sich um generell auftretende Schwierigkeiten. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen (s. Abb. 5.104), daß nicht nur bei Kapillaren mit 27 µm I.D. die Werte für die Flächen deutlich schwanken, sondern daß dieses Problem auch bei 50 µm I.D. auftritt, wenn die injizierte Proteinmenge unter 1 ng Myoglobin liegt. Erhöht man die Analytenmenge, lassen sich die Werte für AU und korr. AU besser reproduzieren.

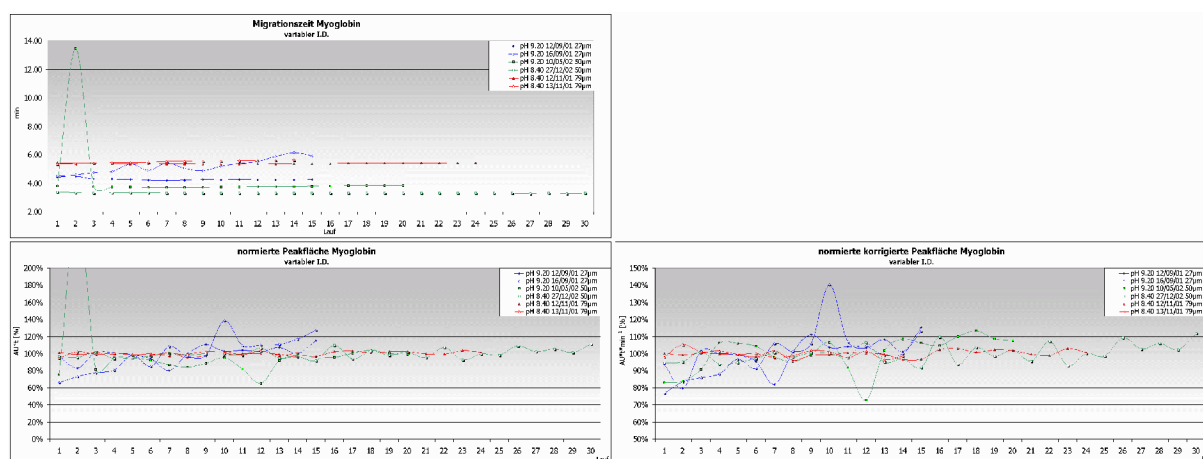


Abbildung 5.104: Ergebnisse Myoglobin

Die Verwendung von Kapillaren mit Durchmessern von 75-100 µm bringt generell keine nennenswerten Nachteile gegenüber solchen mit 50 µm. Da für die Untersuchung der Proteinadsorption Puffer mit Konzentrationen im Bereich von 50-120 mM verwendet werden, um den pH-Wert in den Experimente konstant halten zu können (vgl. Kap. 5.2.5), ist der größere Durchmesser ein limitierender Faktor für die möglichen Feldstärken.

### 5.7.2.7 Diskussion der Teilergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen an Myoglobin zeigen, daß die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse von der injizierten Proteinmenge abhängt. Bei allen Versuchs-



reihen, bei denen etwa 1 ng Protein pro Lauf bestimmt wird, zeigen die Flächen bzw. korrigierten Peakflächen deutlich größere Schwankungen als bei den Untersuchungen in Kapitel 5.7.1. Dies betrifft nicht nur den pH-Bereich unterhalb des IP, sondern auch die Meßreihen bei pH 8,4 und 9,2. Auch durch die Verwendung von höher konzentrierten Puffern mit taxigenen Eigenschaften läßt sich die Analytik nicht verbessern. Die Ergebnisse zeigen auch, daß das Auftreten der Proteinadsorption in den untersuchten Konzentrationsbereichen nicht dadurch ausgelöst wird, daß eine Grenzkonzentration überschritten wird. Vielmehr sind die Auswirkungen auf die Peakflächen bei kleinen Analytenmengen deutlicher ausgeprägt. Daher kann angenommen werden, daß auch in der CZE für den Adsorptionsprozeß eine pH-abhängige Isotherme existiert (vgl. [121]), während die Desorption weitestgehend von der Proteinkonzentration in der Elektrolytlösung unabhängig zu sein scheint.

Die bei pH 6,4 durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß sich auch bei fortlaufender Injektion von Myoglobin (7 ng pro Lauf) kein Gleichgewicht zwischen Ad- und Desorption einstellt. Aus Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens von Myoglobin an Grenzflächen mittels Totalreflexionsspektroskopie (total internal reflection absorption spectroscopy; TIRA) [122] und Slab optical wave guide spectroscopy (SOWG) [123] ist bekannt, daß auf Quarzoberflächen zwischen 90 und 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$  Myoglobin adsorbieren. Nimmt man diese Zahlenwerte zum Maßstab, und berücksichtigt man die Größe der Innenoberfläche von 0,94  $\text{cm}^2$  sowie eine Molmasse von 16,95 kDa, würde eine Proteinmenge von 240-400 ng benötigt, um die gesamte Kapillarmantelfläche mit Myoglobin zu bedecken. In der Versuchsreihe bei pH 6,4 werden etwa 460 fmol Protein pro Lauf injiziert, was selbst bei vollständiger Adsorption höchstens ausreichen würde, um ca. 0,5% der Fläche zu belegen. Da sich Myoglobin in den ersten Läufen der Meßreihe nicht direkt detektieren läßt, sondern nur aufgrund der korrigierten Peakflächen von Acetanilid erfaßt werden kann (s. Kap. 5.7.2.3), absorbiert nur ein Teil des Proteins an der Oberfläche. Dieser kleine Anteil an der Gesamtoberfläche reicht aber aus, um die elektroosmotische Mobilität des Systems deutlich zu verändern. Aus diesem Grund muß die Überlegung verworfen werden, daß eine verlässliche Analytik möglich ist, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption eingestellt hat. Zum einen kann nicht davon ausgegangen werden, daß sich eine monomolekulare Adsorbatschicht ausbildet, zum ande-

ren muß von einem minimalen Rest-EOF ausgegangen werden. Das bedeutet gleichzeitig, daß bei einer geringen Nettomobilität des Proteins mit deutlich längeren Analysenzeiten gerechnet werden muß. Gleichzeitig können durch den Abbau von Proteinen durch Hydrolyse, Oxidation oder Deamidierung [23] weitere Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Meßwerte auftreten.

Außerdem zeigen die durchgeführten Messungen bei pH 6,4, daß durch die Injektion einer SDS-haltigen Lösung keine meßbaren Anzeichen beobachtet werden, die eine teilweise Desorption der Proteinplaques belegen könnten. Im Gegensatz zu den Langzeitversuchen mit mehr als 70 Läufen belegen die Versuche bei pH 5,0, 5,3 und 9,2, daß durch die Verwendung von Tensiden die Desorption von Myoglobin möglich ist, wenn diese Spülschritte spätestens 24 Std. nach Beginn der Proteinuntersuchungen durchgeführt werden.

Das zeitabhängige, unterschiedliche Desorptionsverhalten von Myoglobin gegenüber Tensiden ist auf strukturelle Veränderungen des Proteins zurückzuführen. Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens von Myoglobin an Glasoberflächen mittels TIRA und SOWG [123][124] belegen, daß bei der Anlagerung an die Phasengrenze keine ausgeprägten Veränderungen der Proteinstruktur auftreten. Beide Meßverfahren basieren auf der Soret-Bandenspektroskopie des Häms, bei welcher die Absorption im Bereich um  $\lambda = 408$  nm gemessen wird. Die Lage des Absorptionsmaximums wird durch gebundene Liganden, die Oxidationsstufe des Eisenatoms und die Konformation des Proteins in der unmittelbaren Umgebung des Protoporphyrin-Ringsystems beeinflusst. Da die spektroskopischen Eigenschaften sehr empfindlich auf Veränderungen der Tertiärstruktur reagieren [124], sind beide Verfahren sehr gut geeignet, auch geringfügige Veränderungen zu detektieren. Andere Verfahren wie die dynamische Wärmestromkalorimetrie (DSC), die darauf beruhen, daß der energetische Zustand des Proteins in Lösung und im adsorbierten Zustand bestimmt wird, sind weniger empfindlich, da selbst starke Veränderungen der Tertiärstruktur in der Regel nur geringe Veränderungen der inneren Energie aufweisen.

Die bei der Bildung von Proteinplaques beobachtete Denaturierung und Ausbreitung auf der Oberfläche auftretenden, strukturellen Veränderungen sind mit darauf zurückzuführen, daß durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Kapillarwand sowie der Verdrängung von Wasser-

molekülen aus der Proteinstruktur andere Konformationen begünstigt werden. Diese Prozesse erfolgen aber nicht unmittelbar nach der Anlagerung an das Kieselglas, wie die Ergebnisse der Soret-Bandenspektroskopie zeigen, sondern sind mit einer gewissen Latenzzeit verbunden. Dies erklärt auch, warum bei den Langzeitversuchen bei pH 6,4 keine Desorption beobachtet wird, während bei pH 5 entsprechende Micellen detektiert werden können, obwohl die ionischen Wechselwirkungen bei niedrigerem pH-Wert stärker sind.

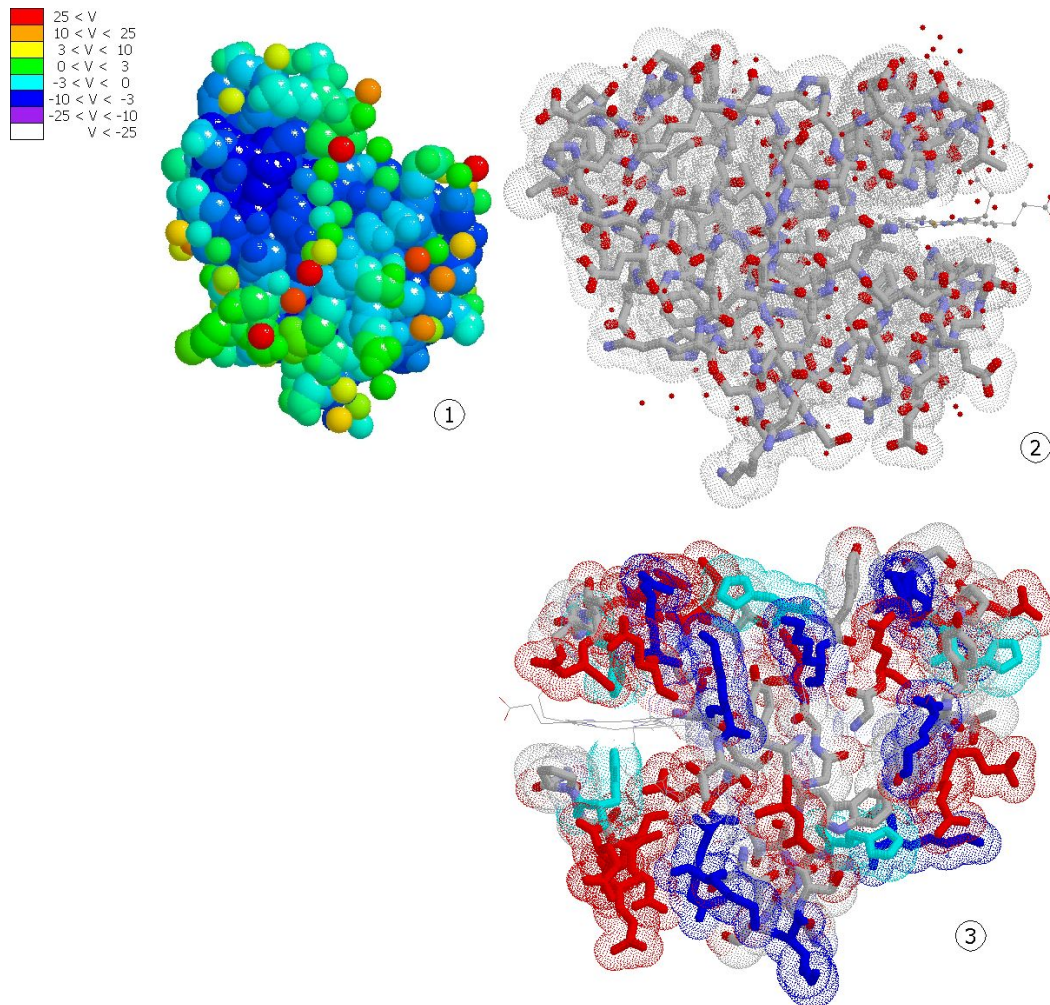


Abbildung 5.105: Struktur und Oberflächenpotential von Myoglobin

In Abb. 5.105 sind das Oberflächenpotential (1), die Proteinstruktur (2) und die Anordnung von geladenen, oberflächennahen Seitenketten (3) von Myoglobin dargestellt. Die gezeigten Strukturen basieren auf röntgenkristallographischen Ergebnissen, die in der Brookhaven Protein Datenbank hinterlegt sind (1GJN.pdb). Anhand der Darstellungen 1 und 3 wird deutlich, daß bei pH 7,0 keine ausgeprägten, positiv geladenen Oberflächenareale in der Proteinstruktur vorkommen. Die basischen Seitenketten (in (3) blau eingefärbt) sind relativ gleichmäßig verteilt und von Glutamin-

und Asparaginsäure-Resten (rot eingefärbt) umgeben. In den Untersuchungen bei pH 6,4 sind im späteren Verlauf der Messungen immer wieder Abbauprodukte des Myoglobins beobachtet worden, deren Migrationsgeschwindigkeit etwa der des internen Standards Neostigmin entspricht. Um diese Beobachtung erklären zu können, muß von einem deutlich positiven geladenen Artefakt ausgegangen werden. Dies ist insofern ungewöhnlich, da durch Deamidierung und Oxidation von Methionin der IP des Proteins abfällt. Um eine entsprechend positive Nettoladung zu erhalten, müssen Brüche der Proteinkette auftreten. Nimmt man beispielsweise an, daß eine Peptidbindung zwischen den beiden ersten, N-terminalen  $\alpha$ -Helices auftritt, steigt der IP des Hauptfragmentes auf 8,75 an (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam1?P68082>) und erklärte das Migrationsverhalten der beobachteten Fraktion.



### 5.8 Ovalbumin – ein Glykoprotein

Bei Ovalbumin handelt es sich um einen der Hauptbestandteile (60-66%) im Ei des Huhns (*Gallus gallus*). Das Protein gehört zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine), weist aber keinerlei inhibitorische Aktivität auf, wie auch Angiotensinogen oder das Thyroxin-bindende Protein [140]. Ovalbumin liegt unter physiologischen Bedingungen konzentrationsabhängig als Di- oder Tetramer vor. Die Primärstruktur des Proteins umfaßt 385 Aminosäuren. Der IP liegt bei 5,2 und die molare Masse des Monomers beträgt 42,8 kDa. Das Protein erfährt einige posttranslationale Veränderungen. Neben der Acetylierung des N-terminalen Endes werden die beiden für Wassermoleküle zugänglichen Cysteinreste (73 und 120) zu einem Cystin oxidiert, während die anderen vier Thiol-Gruppen im hydrophoben Kern unverändert bleiben. Am Asparagin 293 ist eine Kohlenhydrat-Seitenkette N-glykosidisch gebunden. Darüber hinaus erfolgt an den Serin-Resten 68, 236, 240 und 345 eine Phosphorylierung, wobei mono-, di- und trisubstituierte Formen vorliegen. Außerdem existieren zwei genetische Polymorphismen, die sich in jeweils einer Aminosäure unterscheiden (289 und 311). Neben diesen Faktoren, die zur Mikroheterogenität des Proteins beitragen, existieren zwei unterschiedliche Formen, die sich in ihrem Denaturierungsverhalten unterscheiden. Diese als I- bzw. S-Ovalbumin bezeichneten Konformere unterscheiden sich bezüglich ihrer Gelbildnereigenschaften, was aufgrund der weiten Verbreitung von Hühnereiweiß in der Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung ist [141]. Ovalbumin stellt aus diesen Gründen ein komplexes, mikroheterogenes Proteingemisch dar, an dem die Leistungsfähigkeit der CZE-Methode getestet werden kann. Neben dem Vorliegen von verschiedenen Fraktionen, die sich durch das Verhältnis von Ladung zu Radius unterscheiden, stellt die Kohlenhydrat-Seitenkette eine mögliche Herausforderung dar. Aufgrund des extrem hydrophilen Strukturelementes muß damit gerechnet werden, daß die Zuckermoleküle Wasserstoffbrückenbindungen zur Kapillaroberfläche ausbilden und dadurch schlecht reproduzierbare Ergebnisse verursachen. Daneben besitzt Ovalbumin die Eigenschaft, sich in Grenzschichten zwischen hydro- und lipophilen Medien anzureichern [142]. Dieser Vorgang ist mit Änderungen der Tertiärstruktur verbunden, die zu Schwierigkeiten in der CZE führen können. Gelangen beispielsweise die freien Cystein-Reste durch die Denaturierung an die Pro-

teinoberfläche, ist die Vernetzung von Ovalbumin-Molekülen durch intermolekulare Disulfid-Brücken möglich [143].

### 5.8.1 Standardmethode

Der theoretische IP von Ovalbumin liegt bei pH 5,2, wobei nicht berücksichtigt wird, daß durch die Phosphorylierung einerseits und durch die Kohlenhydrat-Seitenkette andererseits Abweichungen vom Literaturwert ergeben können.

#### 5.8.1.1 Untersuchungen bei pH 5,0

Ovalbumin gehört wie auch  $\beta$ -Lactoglobulin zu der Gruppe von relativ sauren Proteinen. Sie unterscheiden sich zwar in der molekularen Masse, haben aber vergleichbare polare Eigenschaften. Der GRAVY-Score (grand average hydropathicity), welcher einen numerischen Wert für die durchschnittliche Hydrophobizität der Aminosäuresequenz angibt, liegt bei Ovalbumin mit -0,006 geringfügig höher als bei  $\beta$ -Lactoglobulin (-0,162), berücksichtigt aber nicht die posttranslationalen Modifikationen. Daher tragen die Untersuchungen bei diesem pH-Wert dazu bei, den möglichen Einfluß der höheren Molmasse auf die Reproduzierbarkeit zu klären.

Bei der Meßreihe wird zunächst die Systempräzision bestimmt, wobei ein 50 mM Acetat-Puffer als Hintergrundelektrolyt verwendet wird. Die Ergebnisse in Tab. 5.8.1.1.1 zeigen, daß stabile elektrophoretische Bedingungen vorliegen. Die bei den Flächenwerten auftretende Streuung der Meßwerte ist auf das Injektionssystem zurückzuführen, da die Schwankungen auf 0,79% abnehmen, wenn die Einzelwerte von Acetanilid und Neostigmin aufeinander bezogen werden.

OVAL-300904		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	5,030	5,014	5,046	0,044	0,883	0,00197
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	40,098	39,819	40,377	0,781	1,948	0,60994
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	7,973	7,910	8,035	0,174	2,183	0,03028
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,817	3,805	3,830	0,034	0,895	0,00117
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	11,754	8,905	14,604	5,440	46,279	29,59081
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	98,428	76,093	120,763	42,638	43,319	1818,03244
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,498	8,302	8,693	0,373	4,389	0,13911
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,968	1,531	2,404	0,834	42,378	0,69524

Tabelle 5.8.1.1.1: EOF-Marker, pH 5,0

Im Gegensatz dazu treten während der Untersuchung von Ovalbumin sehr deutliche Schwankungen auf, da durch die ablaufende Proteinadsorption die elektroosmotische

Mobilität rapide abnimmt. So läßt sich der EOF-Marker (2) bereits nach 14 Läufen nicht mehr detektieren. Anhand des Migrationsverhaltens von Neostigmin (1) läßt sich abschätzen, daß die elektroosmotische Mobilität bis zum 25. Lauf abnimmt und sich bei etwa  $0,48 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  stabilisiert, was einer Migrationszeit von ca. 40 min entspricht. Ovalbumin läßt sich während der Messungen weder detektieren noch als komigrierender Analyt anhand der korr. AU-Werte von Acetanilid oder Neostigmin erfassen. Bedingt durch die EOF-Abnahme läßt sich auch die Verunreinigung des Acetanilids (2a) detektieren.

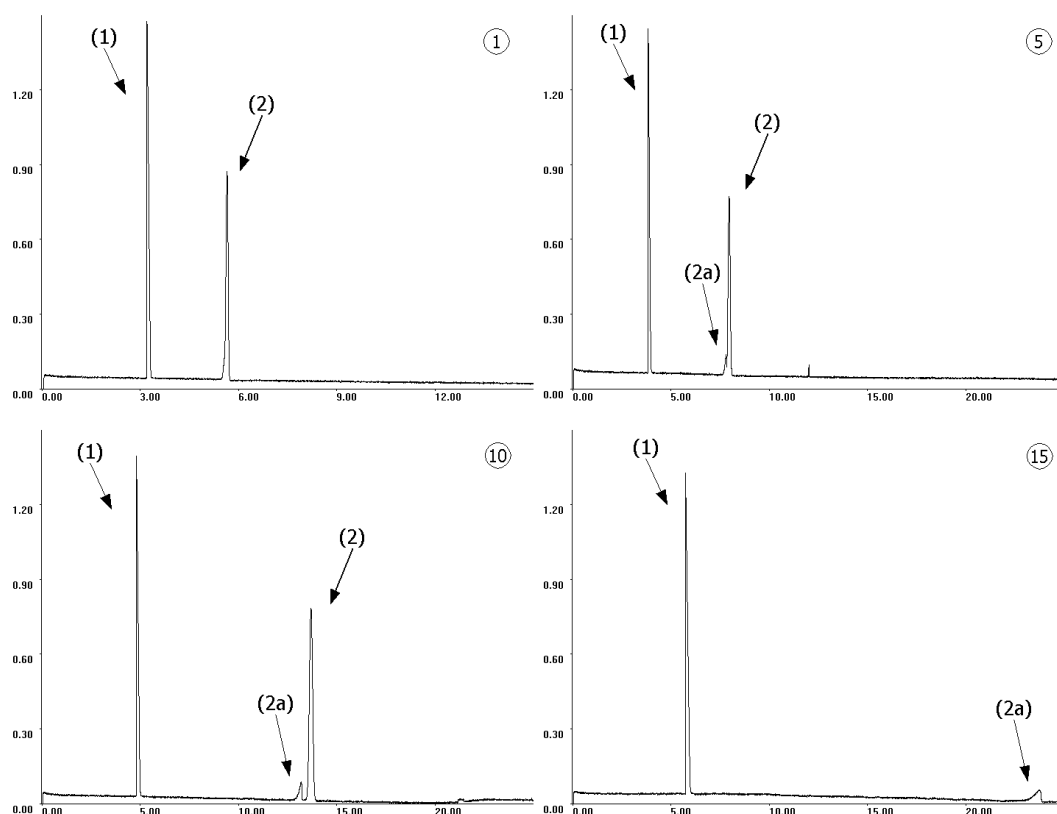


Abbildung 5.106: Ovalbumin ( $\sim 9 \text{ ng}$  pro Injektion; OVAL-300904)  
Acetat-Puffer pH 5,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 43 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 15  
(1) Neostigmin und (2) Acetanilid

In den anschließenden Kontrollversuchen wird die Datenaufnahme auf 40 min verlängert, um den EOF-Marker detektieren zu können. Allerdings nimmt der EOF auch während der zweiten Kontrollreihe weiter ab, so daß sich Acetanilid nur in Lauf 31 (s. Abb. 5.107) beobachten läßt. In den nachfolgenden Elektropherogrammen läßt sich lediglich Neostigmin erfassen, es treten auch keine Spikes auf, welche durch die Zersetzung des Proteins entstehen (vgl. Myoglobin, Kap. 5.7.2.3).



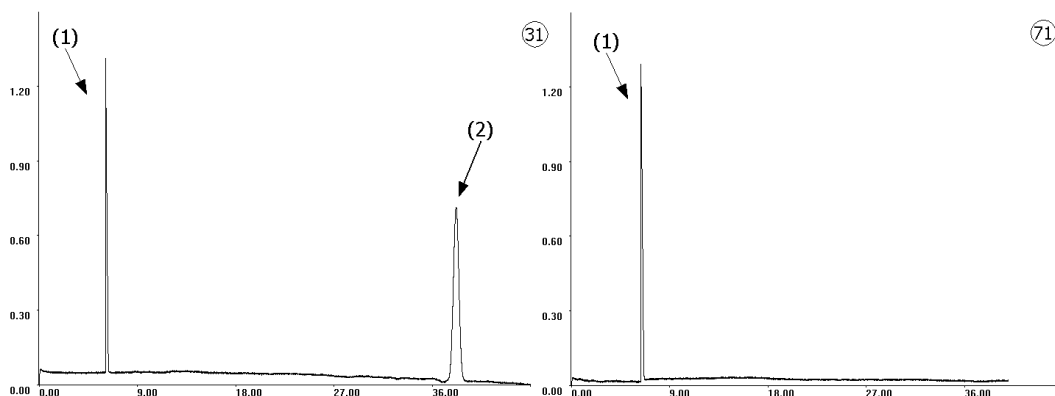


Abbildung 5.107: Systempräzision 2 (OVAL-300904)  
 Acetat-Puffer pH 5,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 43 µA; Läufe 31, 70  
 (1) Neostigmin und (2) Acetanilid

### 5.8.1.2 Untersuchungen bei pH 6,0

Die Untersuchungen bei pH 6,0 werden in einem 50 mM Phosphat-Puffer durchgeführt (vgl. Kap. 9.9.2-9.9.4). Im Vergleich zu den Versuchen bei pH 5,0 ist die Ausgangsvoraussetzung deutlich günstiger, da sowohl die Kapillarwand als auch der makromolekulare Analyt negativ geladen sind. Daher sind weniger stark ausgeprägte Wechselwirkungen von Ovalbumin mit der Kieselglasoberfläche zu erwarten, zumal aufgrund der Proteinstruktur (1OVA.pdb; s. Abb. 5.119) keine Bereiche auf der Oberfläche mit kationischen Domänen vorliegen.

Zu Beginn der Untersuchungen wird die Systempräzision aus 30 Läufen ermittelt. Die Ergebnisse von Acetanilid sind Tab. 5.8.1.2.1 zusammengefaßt. Die in den Meßreihen OVAL-260904 und OVAL-230505 auftretenden Schwankungen der Migrationszeiten und Peakflächen sind auf die verzögerte Einstellung des  $\zeta$ -Potentials an der äußeren Helmholtz-Schicht zurückzuführen (s. Kap. 1.5).

Bei Neostigmin sind die Abweichungen der Migrationszeiten geringer, da sich hier die Eigenmobilität entsprechend positiv auswirkt. Aufgrund der Resultate, die bei den abschließenden Kontrollversuchen erhalten werden, ist die Meßreihe mehrfach durchgeführt worden, um die Reproduzierbarkeit der Beobachtungen abzusichern (s. u.).

Bei den Untersuchungen von Ovalbumin läßt sich das Peakmuster sehr gut reproduzieren (s. Abb. 5.108). Im Vergleich zu den Kontrollmessungen variieren die Migrationszeiten deutlich weniger und liegen bei Neostigmin (1) zwischen 0,50 und 1,56% RSD%. Auch die Werte von Acetanilid (2) streuen wenig (s. Tab. 5.8.1.2.2). Die AU- und korr. AU-Werte schwanken im Unterschied dazu deutlich mehr.

## 5 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Systempräzision 1	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-160604							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,658	3,636	3,680	0,062	1,684	0,00379
Fläche [AU·min]	Acetanilid	28,512	28,315	28,710	0,552	1,937	0,30498
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,795	7,742	7,848	0,148	1,899	0,02192
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,250	5,218	5,282	0,089	1,696	0,00793
OVAL-260904							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	5,827	5,661	5,994	0,465	7,976	0,21603
Fläche [AU·min]	Acetanilid	45,032	43,821	46,244	3,386	7,519	11,46607
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,731	7,696	7,766	0,098	1,264	0,00954
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,313	3,228	3,399	0,239	7,224	0,05729
OVAL-230505							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	5,600	5,525	5,676	0,211	3,763	0,04440
Fläche [AU·min]	Acetanilid	44,551	43,851	45,251	1,956	4,390	3,82574
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,955	7,890	8,020	0,181	2,277	0,03280
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,433	3,388	3,478	0,126	3,658	0,01577

Tabelle 5.8.1.2.1: System-Test, pH 6,0 EOF-Marker Acetanilid

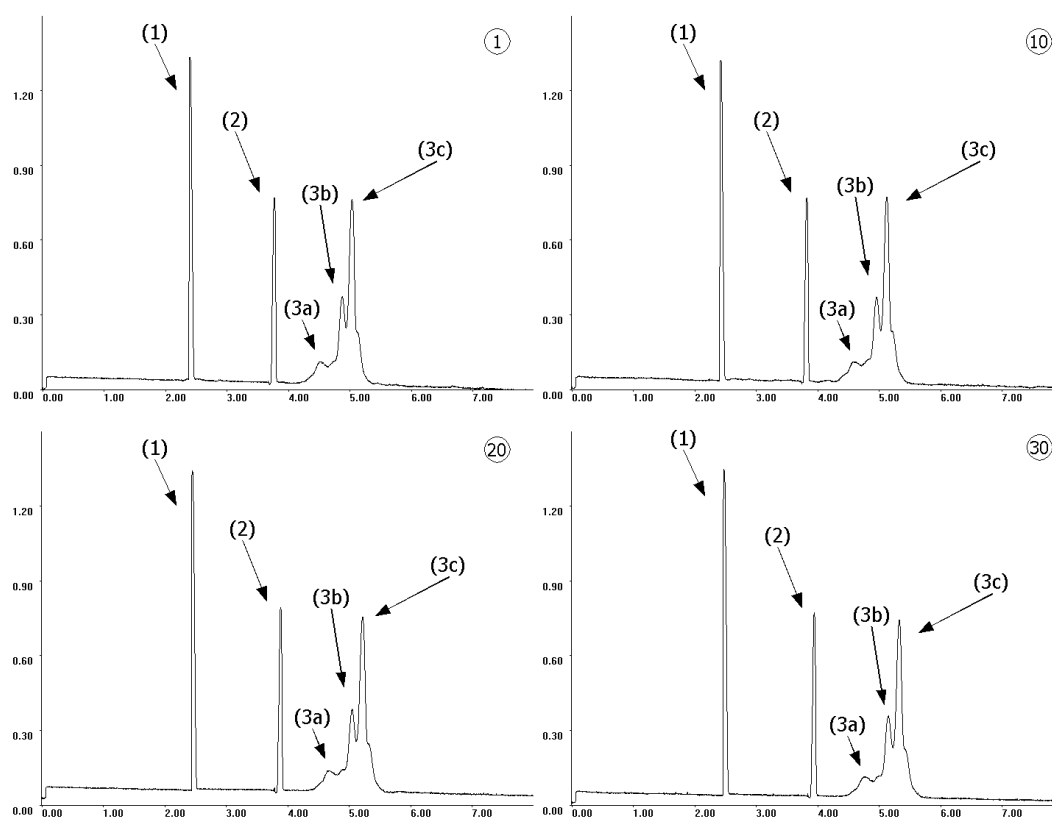


Abbildung 5.108: Ovalbumin (~ 9 ng pro Injektion; OVAL-230505)  
Phosphat-Puffer pH 6,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 53 µA; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Bei der Meßreihe OVAL-230505 tritt der ungewöhnliche Fall auf, daß die Flächen des internen Standards stärker schwanken als die des EOF-Markers. Außerdem zeigen die Meßwerte den gleichen Kurvenverlauf wie das Protein bei der graphischen Darstellung der Resultate. Da die Peakgrenzen von Neostigmin genauso gleichmäßig erkannt werden wie das Peakmaximum, können Integrationsfehler ausgeschlossen

werden. Auch die Bildung relativen Peakflächen, bezogen auf den EOF-Marker, bringt keine Verbesserungen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-160604							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,852	3,833	3,871	0,052	1,361	0,00275
Fläche [AU·min]	Acetanilid	29,636	29,536	29,736	0,280	0,943	0,07814
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,695	7,642	7,749	0,150	1,949	0,02249
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,985	4,961	5,010	0,068	1,364	0,00463
OVAL-260904							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	5,161	5,076	5,247	0,240	4,649	0,05759
Fläche [AU·min]	Acetanilid	37,562	36,513	38,611	2,932	7,805	8,59424
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,269	7,187	7,352	0,230	3,161	0,05279
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,726	3,675	3,778	0,144	3,872	0,02082
OVAL-230505							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	5,613	5,600	5,626	0,036	0,633	0,00126
Fläche [AU·min]	Acetanilid	41,392	41,067	41,718	0,910	2,198	0,82738
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	7,375	7,312	7,438	0,176	2,386	0,03096
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,421	3,413	3,429	0,022	0,642	0,00048

Tabelle 5.8.1.2.2: EOF-Marker, pH 6,0

Diese ungewöhnliche Beobachtung läßt sich in den anderen Meßreihen nicht beobachten. Bei Ovalbumin (3) fällt auf, daß sich insgesamt drei Hauptfraktionen (3a-c) detektieren lassen, wobei sich vermutlich weitere Fraktionen in dem Gemisch befinden, da sich bei 3b und 3c jeweils eine reproduzierbare Schulter beobachten läßt.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-160604							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	5,171	5,139	5,202	0,089	1,718	0,00789
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	123,210	122,582	123,837	1,753	1,423	3,07397
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	23,839	23,609	24,068	0,642	2,692	0,41186
OVAL-260904							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	7,317	7,265	7,369	0,143	1,958	0,02052
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	15,031	14,710	15,351	0,881	5,864	0,77690
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	2,053	2,021	2,086	0,089	4,348	0,00797
OVAL-230505							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	8,712	8,686	8,738	0,072	0,823	0,00515
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	184,612	182,172	187,051	6,818	3,693	46,48049
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	21,193	20,901	21,485	0,816	3,848	0,66517

Tabelle 5.8.1.2.3: Ovalbumin, pH 6,0

Die Ergebnisse von Ovalbumin zeigen (vgl. Tab. 5.8.1.2.3), daß sich bei allen Untersuchungen die Migrationszeiten sehr gut reproduzieren lassen, insbesondere im Vergleich mit  $\beta$ -Lactoglobulin, das einen ähnlichen IP aufweist. Die Schwankungen, die bei Flächen und korrigierten Flächen auftreten, bewegen sich im Bereich von 1,42 bis 3,85% RSD%. Bei der Meßreihe OVAL-260904 treten größere Schwankungen bei den Werten für AU und korr. AU auf, die durch einen Ausreißer im 14. Lauf verursacht

werden. Die Streuung der anderen Läufe liegt auf dem Niveau der anderen Meßreihen. Im Gegensatz dazu tritt bei den Versuchen das Problem auf, daß das Protein am Ende der Datenaufnahme das Detektionsfenster passiert und vollständig registriert wird. Die Integration liefert daher systematisch zu geringe Werte. Wie bereits erwähnt, zeigen die Meßwerte von Neostigmin und Ovalbumin in der Meßreihe OVAL-230505 einen vergleichbaren Verlauf. Insbesondere in den ersten 11 Läufen sind die Schwankungen stark ausgeprägt. Sie lassen sich aber weder beim internen Standard noch beim Protein auf Integrationsprobleme zurückführen, da die Peakgrenzen gleichmäßig gesetzt werden. Die Vermutung, daß Probleme bei der Probeninjektion zu den Unregelmäßigkeiten führen, muß aufgrund der konstanten Werte von Acetanilid verworfen werden.

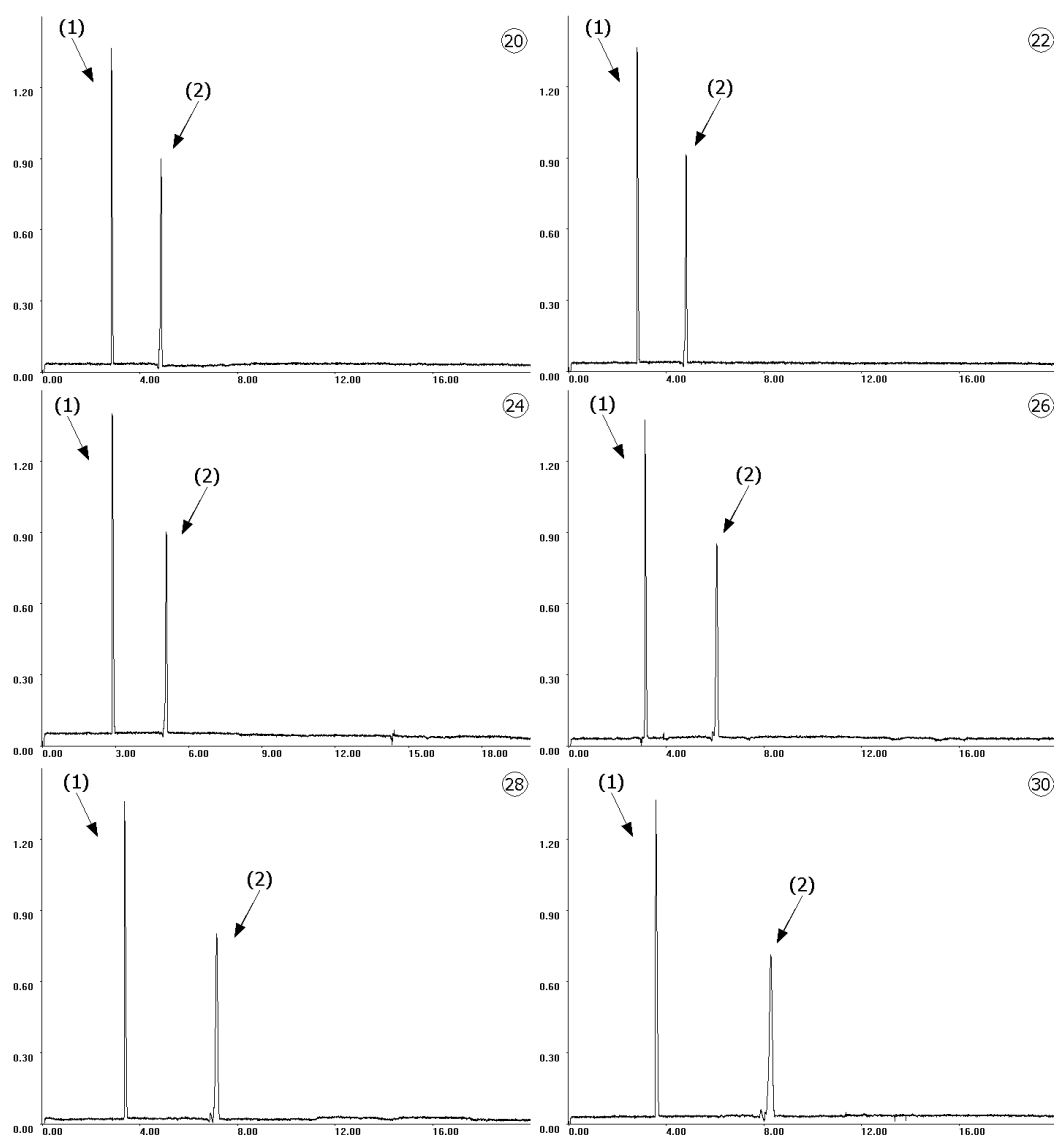


Abbildung 5.109: System-Test 2 (OVAL-230505)  
Phosphat-Puffer pH 6,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 53 µA; Läufe 22, 24, 26, 28, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Bei den abschließenden Kontrollversuchen beobachtet man eine ungewöhnliches Verhalten der Vergleichssubstanzen (s. Abb. 5.109). Während bei der Meßreihe OVAL-160604 der Migrationszeiten von Neostigmin und Acetanilid ab dem fünften Lauf deutlich zunehmen, tritt dieser Effekt bei den Meßreihen OVAL-260904 und OVAL-230505 erst ab der 20. Messung auf. Die anfangs beobachtete Zunahme der elektroosmotischen Mobilität wird durch den rapiden Abfall deutlich überlagert (vgl. Abb. 5.110).

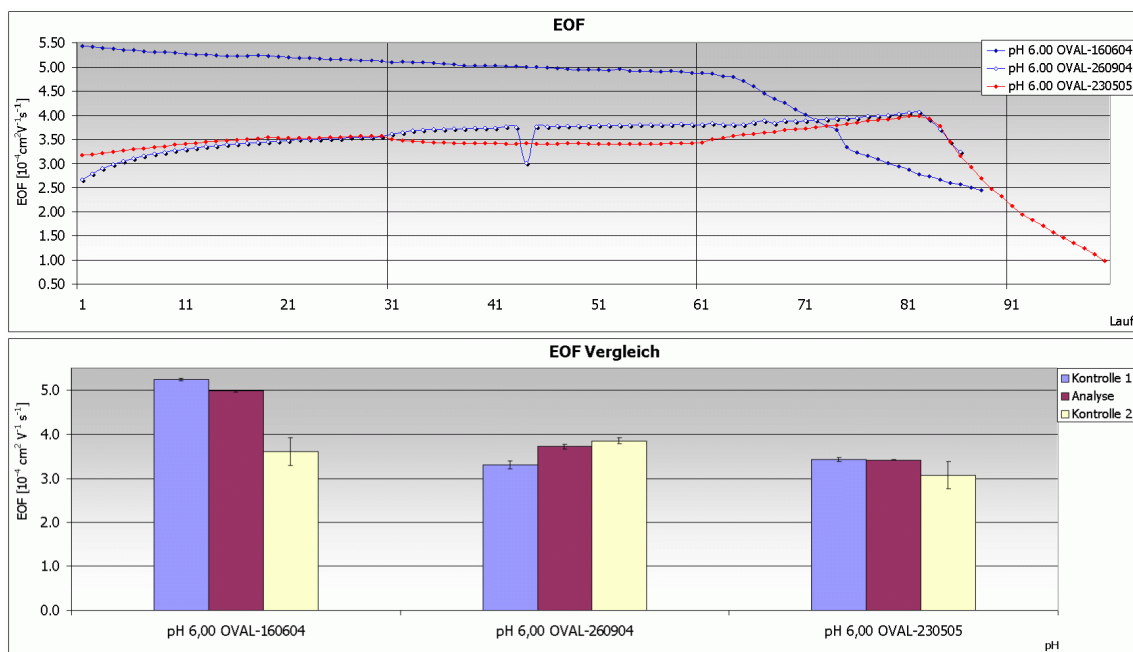


Abbildung 5.110: EOF pH 6,0 (Serien OVAL-160604, OVAL-260904 u. OVAL-230505)

Da sich diese Beobachtung in drei Meßreihen reproduzieren läßt, muß davon ausgegangen werden, daß während der Untersuchung von Ovalbumin ein Teil des Proteins adsorbiert wird. Die gebildete Plaque scheint mit einer gewissen Latenzzeit deutlichen Alterungsprozessen zu unterliegen, die zu einer deutlichen Veränderung des  $\zeta$ -Potentials und damit des Migrationsverhaltens führen.

Bei der Darstellung der durchschnittlichen elektroosmotischen Mobilität in einem Balkendiagramm läßt sich der deutliche Abfall der  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte in den Meßreihen OVAL-160604 und OVAL-230505 deutlich erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei der Meßreihe OVAL-260904 diese Darstellungsweise nicht geeignet, die beobachteten Probleme visuell darzustellen. Grund hierfür ist, daß die  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte zunächst ansteigen, dann abfallen und am Ende der Reihe außerhalb des Meßbereiches liegen. Das arithmetische Mittel der  $\mu_{\text{EOF}}$  spiegelt diesen Verlauf der Meßwerte nicht wider, so daß im Balkendiagramm der Unterschied zu den Ergebnissen der Proteinuntersuchung nur ge-

ring ist. Allerdings zeigt die graphische Darstellung der einzelnen Meßwerte deutlich die auftretenden Unregelmäßigkeiten.

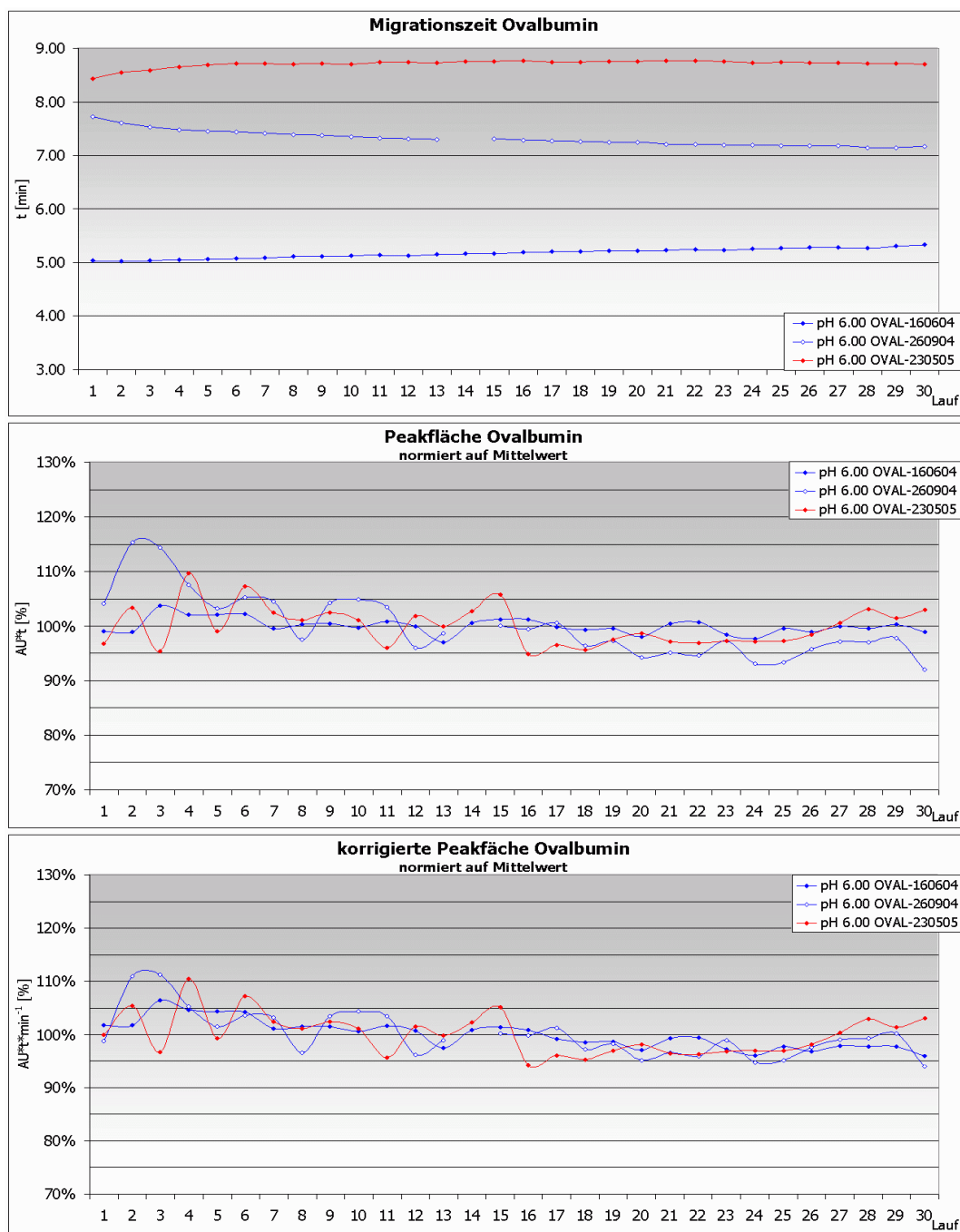


Abbildung 5.111: Ovalbumin, pH 6,0 (Serien OVAL-160604, OVAL-260904 u. OVAL-230505)

Bei der graphischen Darstellung der Meßwerte von Ovalbumin in Abb. 5.111 wird wegen der beschriebenen Integrationsprobleme in Reihe OVAL-260904 darauf verzichtet, die absoluten Werte der Flächen und korrigierten Flächen darzustellen. Um die Werte optisch besser miteinander vergleichen zu können, werden die Einzelwerte auf den Mittelwert der jeweiligen Meßreihe bezogen. Auf diese Weise lassen sich die prozentualen Abweichungen vom arithmetischen Mittel leicht darstellen und vergleichen.

Die graphische Auswertung zeigt, daß sich die Migrationszeiten innerhalb einer Meßreihe sehr gut reproduzieren lassen. Da zwischen den Meßwerten der einzelnen Versuchsreihen sehr deutliche Unterschiede bestehen, werden die effektiven Mobilitäten der Analyten berechnet (s. Tab. 5.8.1.2.4). Unterstellt man, daß sich der Quotient aus effektiver Ladung und effektivem Radius nicht ändert (s. Gl. 11, Kap. 1.4.3), ist  $\mu_{\text{eff}}$  eines Analyten antiproportional zur Viskosität  $\eta$  des Hintergrundelektrolyten bei einer Temperatur  $T$ . Vergleicht man die  $\mu_{\text{eff}}$ -Werte von Ovalbumin und Neostigmin miteinander, so ist zu konstatieren, daß die Unterschiede primär auf die Temperaturunterschiede an den Versuchstagen zurückzuführen sind.

	$\mu_{\text{eff}}$ (Neostigmin)	RSD%	$\mu_{\text{EOF}}$	RSD%	$\mu_{\text{eff}}$ (Ovalbumin)	RSD%	$\mu_{\text{eff}}$ rel.(Oval)
OVAL-160604	2.913	0.773	4.985	1.364	-1.271	0.500	-0,150
OVAL-260904	2.753	0.213	3.751	1.373	-1.126	0.337	-0,148
OVAL-230505	2.796	0.426	3.421	0.642	-1.217	0.428	-0,156

Tabelle 5.8.1.2.4: Vergleich Nettomobilitäten, pH 6,0

Um den Einfluß der Viskosität  $\eta$  eliminieren und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wird die effektive Mobilität von Ovalbumin auf jene von Neostigmin bezogen. Die resultierende relative  $\mu_{\text{eff}}$  ist temperaturunabhängig und zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Meßreihen. Trotz der unterschiedlichen Migrationszeiten gibt es keine meßbaren Anzeichen für eine Proteinadsorption. Die Meßwerte für Flächen und korrigierte Flächen unterliegen keinen ausgeprägten Trends, sondern streuen relativ gleichmäßig um den Mittelwert. Bei der Meßreihe OVAL-230505 scheint ein abnehmender Trend vorzuliegen. Setzt man die Ergebnisse in Relation zum internen Standard, bestätigt sich die Vermutung nicht, so daß anhand der Flächen nicht davon ausgegangen werden kann, daß Ovalbumin in nennenswerten Mengen adsorbiert. Die Ergebnisse der jeweiligen zweiten Kontrollreihe stehen in direktem Widerspruch dazu, da sich die Abnahme des EOF in allen Meßreihen reproduzieren läßt. Neben der postulierten Proteinadsorption müssen auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden. Dazu gehört auch der Einfluß von Lyophilisationszusätzen, die bei der Gefriertrocknung von Proteinen zugesetzt werden. Auf weiterführende Untersuchungen wird in Kapitel 5.8.2 eingegangen.

### 5.8.1.3 Untersuchungen bei pH 6,5

In den Untersuchungen bei pH 6,5 soll geklärt werden, ob die bei pH 6,0 beobachteten Prozesse ebenfalls während der zweiten Kontrollserie auftreten, oder es sich um ein pH-spezifisches Phänomen bei Ovalbumin handelt. Da in der ersten Meßreihe (s. OVAL-010604, Kap. 9.9.5) die Kapillare nach dem 20. Lauf der zweiten Kontrollreihe gebrochen ist, wird die Versuchsreihe wiederholt (OVAL-120505, Kap. 9.9.6).

Bei den einleitenden Kontrollversuchen fällt auf, daß die Migrationszeiten in den ersten 10 Läufen der Reihe OVAL-010604 noch abnehmen, da sich die elektroosmotische Mobilität noch merklich verändert. Berücksichtigt man für die Auswertung lediglich die Läufe 11-30, reduzieren sich die Schwankungen von  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  im Vergleich zu den Werten in Tab. 5.8.1.3.1 auf etwa 1,5% RSD% bzw. halbiert sich die Streuung der AU-Werte. Die Resultate für Neostigmin zeigen das gleiche Verhalten, so daß von einer Hysteresis des EOF ausgegangen werden muß.

Systempräzision 1			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-010604									
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid		4,680	4,575	4,785	0,294	6,278	0,08631
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		33,352	32,521	34,182	2,321	6,960	5,38881
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid		7,126	7,061	7,190	0,181	2,535	0,03262
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid		4,117	4,031	4,203	0,241	5,844	0,05789
OVAL-120505									
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid		3,707	3,698	3,716	0,025	0,670	0,00062
Fläche	[AU·min]	Acetanilid		42,235	42,113	42,357	0,340	0,805	0,11552
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid		11,393	11,360	11,425	0,090	0,794	0,00817
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid		5,179	5,167	5,192	0,035	0,671	0,00121

Tabelle 5.8.1.3.1: System-Test, pH 6,5 EOF-Marker (Serien OVAL-010604 u. OVAL-120505)

Bei den Untersuchungen von Ovalbumin zeigt sich bei beiden Meßreihen ein reproduzierbares Peakmuster (s. Abb. 5.112), das auch bei pH 6,0 beobachtet wird. Neben den Hauptfraktionen 3a, 3b und 3c des Ovalbumins lassen sich zwei weitere Fraktionen beobachten. Diese sind als Schultern zwischen 3a und 3b bzw. auf der abfallenden Seite von 3c zu erkennen. Wie auch bereits bei pH 6,0 beobachtet, lassen sich die Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe sehr gut reproduzieren.

Die elektroosmotische Mobilität unterscheidet sich hingegen signifikant im Vergleich der Reihen untereinander. Auch hier ist die Ursache in den Temperaturen zu sehen, bei denen die Versuche durchgeführt werden. Um diesen Einfluß auf die Migrationsgeschwindigkeiten und effektiven Mobilitäten der Analyten eliminieren zu können,



werden zunächst die  $\mu_{\text{eff}}$ -Werte aus den jeweiligen Läufen berechnet. Anschließend werden die Resultate statistisch ausgewertet (s. Tab. 5.8.1.3.2).

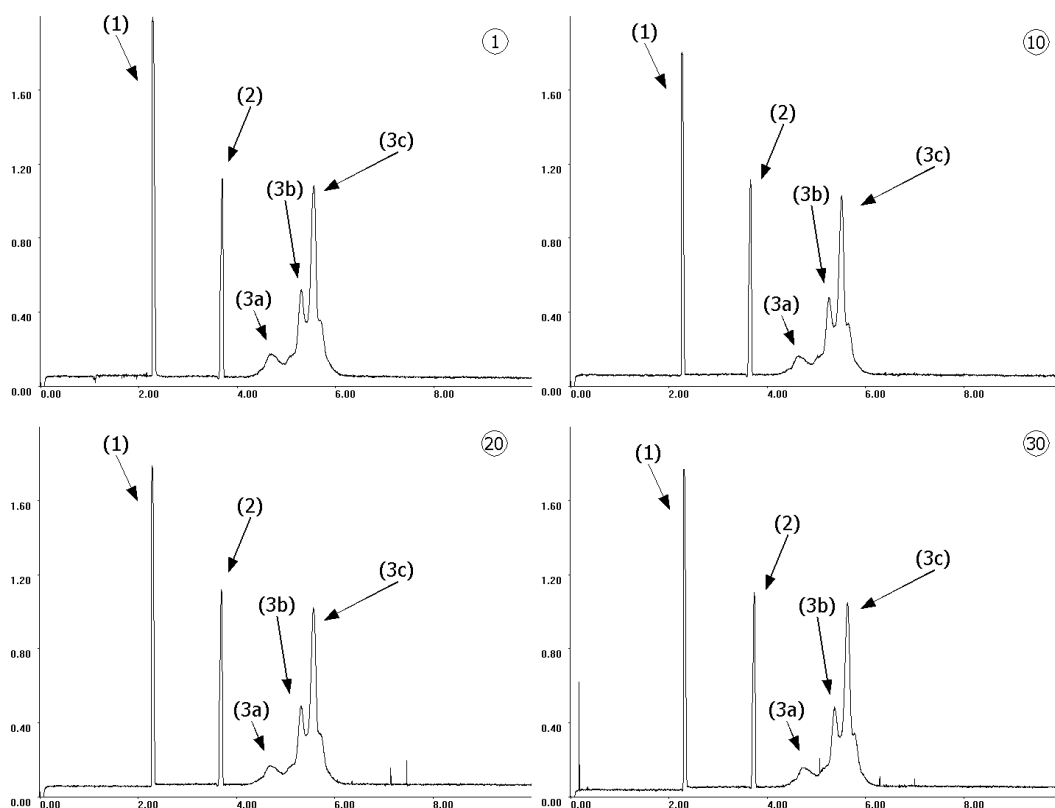


Abbildung 5.112: Ovalbumin ( $\sim 10$  ng pro Injektion; OVAL-120505)  
Phosphat-Puffer pH 6,5,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 65 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Aufgrund der Antiproportionalität von Viskosität und effektiver Mobilität lassen sich die Ergebnisse nicht direkt vergleichen. Unterstellt man jedoch, daß sich die Viskosität der Lösung während der Untersuchungen nicht nennenswert verändert, läßt sich anhand des Quotienten von  $\mu_{\text{eff}}(\text{Neostigmin})$  und  $\mu_{\text{eff}}(\text{Ovalbumin})$  prüfen, ob sich das Ladungs-/Radius-Verhältnis des Proteins verändert. Da sich beide Quotienten nur wenig unterscheiden ( $-0,5420$  und  $-0,5654$ ), werden die Differenzen von  $t_{\text{Mig}}$  und  $\mu_{\text{eff}}$  durch Temperaturunterschiede verursacht und nicht durch ein abweichendes Adsorptionsverhalten oder Konformationsänderungen. Die in den Untersuchungen bestimmten Flächen und korrigierten Peakflächen von Acetanilid, Neostigmin und Ovalbumin unterliegen geringfügigen Streuungen (vgl. Tab. 5.8.1.3.3 und 5.8.1.3.4), die sich teilweise auf Ungenauigkeiten des Injektionssystems zurückführen lassen.

	$\mu_{\text{eff}}$ (Neostigmin)	RSD%	$\mu_{\text{EOF}}$	RSD%	$\mu_{\text{eff}}$ (Ovalbumin)	RSD%
OVAL-010604	2,815	1,093	4,438	1,375	-1,592	0,649
OVAL-120505	3,235	0,836	5,218	0,965	-1,753	0,862

Tabelle 5.8.1.3.2: Vergleich Nettomobilitäten, pH 6,5

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-010604							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	4,327	4,305	4,348	0,059	1,367	0,00350
Fläche [AU·min]	Acetanilid	30,037	29,823	30,251	0,599	1,994	0,35860
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	6,943	6,901	6,985	0,117	1,688	0,01374
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,438	4,417	4,460	0,061	1,375	0,00372
OVAL-120505							
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	3,680	3,667	3,693	0,036	0,966	0,00126
Fläche [AU·min]	Acetanilid	42,873	42,518	43,228	0,992	2,315	0,98469
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	11,652	11,528	11,776	0,346	2,971	0,11985
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	5,218	5,200	5,236	0,050	0,965	0,00253

Tabelle 5.8.1.3.3: System-Test, pH 6,5 EOF-Marker

Einzig die Resultate für Ovalbumin in der Reihe OVAL-010604 sind auf Schwankungen der Basislinie zurückzuführen, die sich bei der Peakform des Proteins deutlicher auswirken als bei den Vergleichssubstanzen.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
OVAL-010604							
t <sub>Mig</sub>	[min]      Ovalbumin	6,748	6,692	6,804	0,157	2,325	0,02462
Fläche	[AU·min]      Ovalbumin	136,115	131,132	141,097	13,451	9,882	180,93859
korr. Fläche	[AU]      Ovalbumin	20,095	19,464	20,727	1,705	8,485	2,90752
OVAL-120505							
t <sub>Mig</sub>	[min]      Ovalbumin	5,543	5,522	5,563	0,057	1,033	0,00328
Fläche	[AU·min]      Ovalbumin	223,278	220,581	225,975	7,537	3,375	56,80127
korr. Fläche	[AU]      Ovalbumin	40,284	39,795	40,773	1,367	3,393	1,86827

Tabelle 5.8.1.3.4: Ovalbumin, pH 6,5 (Serien OVAL-010604 u. OVAL-120505)

Bei den abschließenden Versuchsreihen liegen die Streuungen der t<sub>Mig</sub>- und μ<sub>EOF</sub>-Werte zwischen 0,2 und 2,2% RSD%, so daß davon ausgegangen werden kann, daß keine zeitlich verzögerten Veränderungen an der Kapillaroberfläche auftreten, weder nach 20 noch nach 30 Kontrollversuchen.

#### 5.8.1.4 Untersuchungen bei pH 7,0

Die Untersuchungen von Ovalbumin werden bei pH 7,0 in einem 50 mM Phosphat-Puffer durchgeführt (s. Kap. 9.9.7). Durch die Versuchsreihe OVAL-210704 soll geklärt werden, wie sich durch die größer werdende Differenz zwischen IP und pH-Wert und den damit verbundenen Veränderungen der Oberflächenpotentiale sich das Migrationsverhalten des Proteins verändert. Da sowohl das ζ-Potential als auch die Ladung von Ovalbumin negativere Werte annehmen, sollte auch die Tendenz zur Adsorption an der Kieselglasoberfläche abnehmen und besser reproduzierbare Flächenwerte ermöglichen.

Wie auch bei den bisher durchgeführten Versuchsreihen wird zunächst die Systempräzision aus 30 Läufen ermittelt. Die in Tab. 5.8.1.4.1 präsentierten Werte für Acetanilid weisen relativ hohe Schwankungen für den System-Test auf. Diese sind jedoch darauf zurückzuführen, daß sich die elektroosmotische Mobilität zu Beginn der Messungen noch nicht stabilisiert hat. Berücksichtigt man die Werte aus den Läufen 11-30, sinken die RSD%-Werte für  $\mu_{\text{EOF}}$ ,  $t_{\text{Mig}}$ , AU und korr. AU auf unter 1,17%. Die Abweichungen von Neostigmin liegen insgesamt niedriger, allerdings tragen auch hier die ersten 10 Läufe erheblich zur Gesamtstreuung bei. Die extrem hohen Werte für den EOF von  $9,1 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  sind auf einen Anzeigefehler des Meßgerätes für die angelegte Spannung zurückzuführen. Die Berechnung der elektrophoretischen Mobilität basiert auf den vom Gerät angezeigten Spannungswerten, so daß die  $\mu_{\text{EOF}}$ -Werte bei dieser Meßreihe nicht die wirklichen Werte widerspiegeln.

OVAL-210703		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,097	3,054	3,139	0,119	3,855	0,01425
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	209,610	207,444	211,775	6,051	2,887	36,61620
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	67,718	67,297	68,138	1,175	1,735	1,37971
EOF	[ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	9,130	9,011	9,250	0,334	3,662	0,11178
Experiment								
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Acetanilid	3,105	3,088	3,122	0,046	1,492	0,00215
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	212,269	211,468	213,069	2,237	1,054	5,00572
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	68,381	67,882	68,880	1,395	2,040	1,94519
EOF	[ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	9,095	9,047	9,144	0,135	1,486	0,01828

Tabelle 5.8.1.4.1: Ovalbumin-Untersuchung, pH 7,0 EOF-Marker

Bei der Untersuchung von Ovalbumin ist zu beobachten, daß die Meßwerte insgesamt weniger streuen als beim vorausgegangenen System-Test. Vergleicht man die Werte mit denen aus den letzten 20 Läufen der ersten Kontrollreihe, treten keine nennenswerten Unterschiede auf. Die Migrationszeiten von Neostigmin, Acetanilid und Ovalbumin schwanken zwischen 1,38 und 1,66% RSD%. Die Elektropherogramme zeigen (s. Abb. 5.113), daß sich das Peakmuster gut reproduzieren läßt, im Vergleich aber zu den vorausgegangenen Meßreihen Unterschiede aufweist. Während der Peak des internen Standards (1) gewohnt schmal und scharf begrenzt ist, zeigt das Acetanilid-Signal (2) eine ungewöhnliche Breite und Asymmetrie.

Aufgrund dieser Beobachtung ist es denkbar, daß sich ein weiterer Substanzpeak mit dem des EOF-Markers überlagert. Allerdings besteht ein Widerspruch zwischen dieser Überlegung und den Ergebnissen der statistischen Auswertung. Sowohl die Werte

der Flächen als auch der korrigierten Flächen der beiden Kontrollserien weichen um knapp 1,2% von den Werten aus der Proteinuntersuchung ab, sind aber schmaler und symmetrisch.

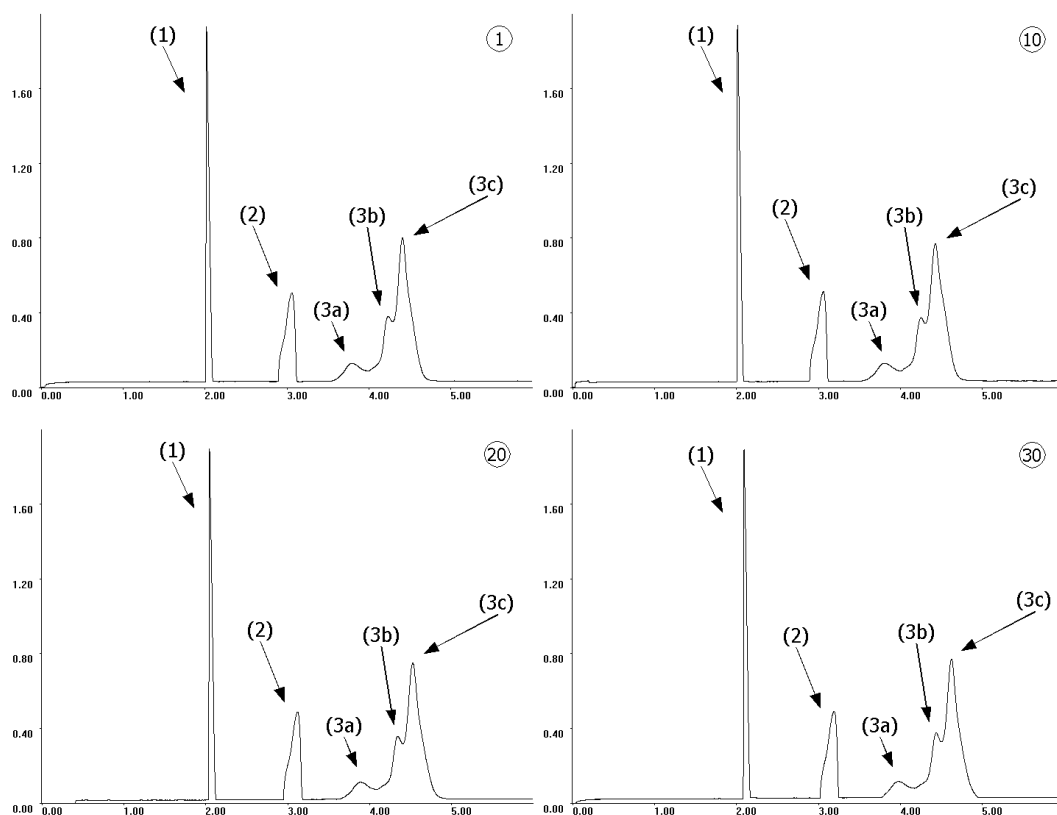


Abbildung 5.113: Ovalbumin ( $\sim 11$  ng pro Injektion; OVAL-210703)  
Phosphat-Puffer pH 7,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 103 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Beim Vergleich des Ovalbumin-Peaks (3) mit dem Peakmuster der vorausgegangenen Untersuchungen zeigt sich, daß durch die deutlich höhere elektroosmotische Mobilität die Peakbreite abnimmt. Dies führt dazu, daß die bisher beobachteten Schultern zwischen den Fraktionen 3a und 3b bzw. rechts von 3c nicht mehr auftreten. Darüber hinaus muß festgehalten werden, daß sich auch die effektive Mobilität des Proteins in Relation zu Neostigmin vergrößert. Unter Annahme einer unveränderten Konformation hat sich die Ladung des Proteins erhöht. Die Zunahme von  $\mu_{\text{eff}}$  wird aber durch den hohen EOF überkompensiert, so daß die Migrationszeiten insgesamt abnehmen (vgl. auch Tab. 5.8.1.4.2 und 5.8.1.2.3 und 5.8.1.3.4). Die Werte für die Flächen und korrigierten Flächen schwanken maximal um 2,89% RSD%, was etwas weniger ist als bei den bisherigen Meßreihen. Durch die Optimierung der Methodenparameter sind weitere Verbesserungen zu erwarten.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	4,493	4,466	4,520	0,074	1,655	0,00553
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	735,875	730,266	741,483	15,673	2,130	245,65715
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	163,835	162,139	165,532	4,742	2,894	22,48655

Tabelle 5.8.1.4.2: Ovalbumin, pH 7,0 (Serie OVAL-210703)

Bei den abschließenden Kontrollmessungen treten keine Schwankungen auf, die Anlaß zu der Vermutung geben würden, daß sich die Oberflächeneigenschaften der Kapillare nach der Untersuchung von Ovalbumin weiter verändern.

### 5.8.1.5 Untersuchungen bei pH 8,4

Bei den bisherigen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß sich im pH-Bereich von 6,0 bis 7,0 die Meßwerte deutlich besser reproduzieren lassen als z.B. bei  $\beta$ -Lactoglobulin. Bei den bereits untersuchten Proteinen nehmen die Schwankungen der Meßwerte mit zunehmendem pH-Wert, mit Ausnahme der bovine Catalase in reinen Borat-Puffern, ab. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß bei Ovalbumin weitere Verbesserungen erzielt werden können, wenn entsprechend alkalische Elektrolytlösungen verwendet werden. Bei den Untersuchungen wird ein 120 mM Borat-Puffer mit einem pH-Wert von 8,4 verwendet (s. Kap. 9.9.8). Als interner Standard wird Melamin verwendet, das mit Acetanilid komigriert und den Vorteil eines deutlich höheren Absorptionskoeffizienten aufweist. Die Systempräzision wird zu Beginn aus 15 Kontrollversuchen bestimmt, deren Resultate in Tab. 5.8.1.5.1 zusammengefaßt sind. Die Schwankungen liegen für alle relevanten Parameter unter 1% RSD%, so daß von stabilen Bedingungen ausgegangen werden kann.

OVAL-070703	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	2,131	2,128	2,133	0,005	0,254	0,00003
Fläche [AU·min]	Melamin	209,055	208,000	210,110	2,085	0,997	4,34791
korr. Fläche [AU]	Melamin	98,122	97,699	98,545	0,836	0,852	0,69837
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	9,012	9,000	9,023	0,023	0,253	0,00052
Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Melamin	2,165	2,153	2,177	0,034	1,556	0,00114
Fläche [AU·min]	Melamin	200,309	199,810	200,808	1,394	0,696	1,94215
korr. Fläche [AU]	Melamin	92,564	91,871	93,257	1,937	2,092	3,75068
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Melamin	8,872	8,822	8,921	0,139	1,562	0,01919

Tabelle 5.8.1.5.1: Ovalbumin-Untersuchung, pH 8,4 EOF-Marker

Die Elektropherogramme der Proteinuntersuchung zeigen, daß sich das Peakmuster während der gesamten Versuchsreihe sehr gut reproduzieren läßt (s. Abb. 5.114). Im Vergleich zu den Läufen bei pH 7,0 fällt auf, daß die Migrationszeiten von Melamin

und Acetanilid (1) sowie von Ovalbumin (3) deutlich kürzer ausfallen, was auf hohen EOF unter den Versuchsbedingungen hinweist. Damit verbunden ist auch die deutlich geringere Breite der Proteinpeaks, so daß sich die Hauptfraktionen (3a-c) stärker überlagern. Hinzu kommt, daß mit steigendem pH-Wert die Unterschiede zwischen den Ladungs-/Radius-Verhältnissen der einzelnen Fraktionen abnehmen.

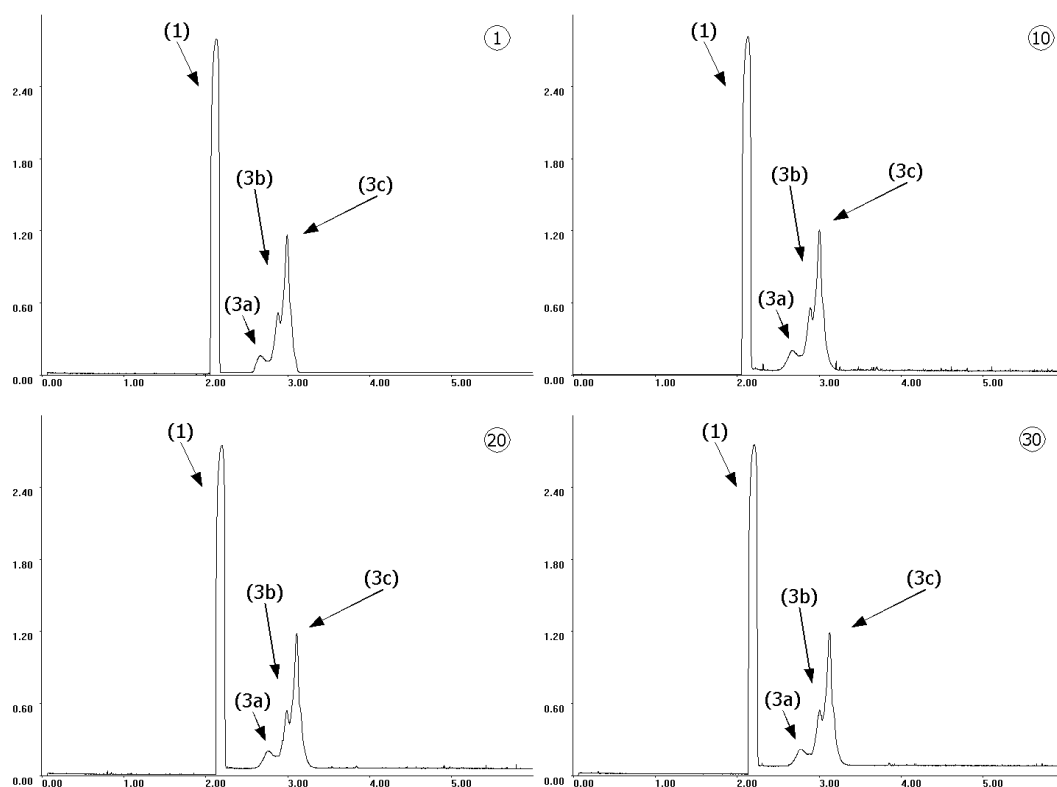


Abbildung 5.114: Ovalbumin ( $\sim 11$  ng pro Injektion; OVAL-070703)  
Borat-Puffer pH 8,4,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 41 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Bei den Migrationszeiten aller Analyte fällt auf, daß deutlich größere Schwankungen auftreten als bei den Kontrollversuchen vor und nach der Proteinuntersuchung. Außerdem beobachtet man bei Ovalbumin, daß die Flächenwerte deutlich stärker streuen als bei Melamin/Acetanilid. Setzt man die Meßwerte in Relation zu den Werten des internen Standards läßt sich der Injektionsfehler zwar eliminieren, die resultierenden RSD%-Werte liegen jeweils knapp unter 3,1%.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\sigma$	RSD %	$\sigma^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	3,060	3,040	3,081	0,057	1,847	0,00320
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	129,664	128,093	131,235	4,389	3,385	19,26671
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	42,385	41,762	43,008	1,740	4,105	3,02800

Tabelle 5.8.1.5.2: Ovalbumin, pH 8,4 (OVAL-070703)

Nimmt man die graphische Darstellung der Meßwerte zu Hilfe (s. Abb. 5.118), stellt man fest, daß bei den Läufen 10-15 überdurchschnittliche Abweichungen auftreten,

die sich weder durch das Injektionssystem noch durch Integrationsfehler verursacht werden. Im Gegensatz dazu liegen die Abweichungen der AU- und korr. AU-Werte der restlichen 24 Läufe 1,64% bzw. 2,58% RSD%, so daß von temporären, proteinimmanenten Problemen ausgegangen werden muß. Bei den abschließenden Kontrollversuchen treten keine nennenswerten Schwankungen auf, so daß die RSD% bei den relevanten Parametern  $t_{\text{Mig}}$ ,  $\mu_{\text{EOF}}$ , AU und korr. AU unter 1,17% liegen.

### 5.8.1.6 Untersuchungen bei pH 9,2

Die Untersuchungen bei pH 8,4 zeigen, daß bei Ovalbumin möglicherweise Komplikationen in alkalischer Lösung auftreten. Um zu überprüfen, ob sich temporären Unregelmäßigkeiten auch bei anderen pH-Werten beobachten lassen, werden weitere Messungen bei pH 9,2 durchgeführt. Dabei wird ein 100 mM Borat-Puffer verwendet (s. Kap. 9.9.9). Die bei der Durchführung des System-Tests auftretenden Schwankungen der Flächenwerte sind darauf zurückzuführen, daß der Peak der komigrierenden Substanzen Melamin und Acetanilid ein deutliches Tailing aufweist. Bei der Integration führt der langsame Abfall des Meßsignals dazu, daß die Peakbegrenzungen ungleichmäßig gesetzt werden und dadurch die Peakbreite eine RSD% von 14% aufweist (s. Tab. 5.8.1.6.1). Diese Schwankungen werden von Temperaturänderungen während der ersten Läufe überlagert, so daß auch die Migrationszeiten schwanken.

OVAL-290603			Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Systempräzision									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Melamin	2,766	2,738	2,795	0,057	2,059	0,00325
Fläche	[AU·min]		Melamin	260,979	255,732	266,226	10,369	3,973	107,51007
korr. Fläche	[AU]		Melamin	94,354	92,583	96,125	3,500	3,709	12,24864
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Melamin	6,943	6,872	7,015	0,141	2,036	0,01999
Experiment									
$t_{\text{Mig}}$	[min]		Melamin	2,774	2,753	2,795	0,059	2,126	0,00348
Fläche	[AU·min]		Melamin	268,885	265,783	271,986	8,667	3,223	75,11819
korr. Fläche	[AU]		Melamin	96,949	96,032	97,866	2,562	2,643	6,56415
EOF	[ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]		Melamin	6,925	6,873	6,978	0,148	2,133	0,02181

Tabelle 5.8.1.6.1: Ovalbumin-Untersuchung, pH 9,2 EOF-Marker

Die Probleme, die aus dem Peaktiling von Melamin und Acetanilid (1) resultieren (s. Abb. 5.115), treten auch bei der Proteinuntersuchung auf und tragen zur Streuung der Flächenwerte bei. Im Vergleich zu den Messungen bei pH 8,4 ist die elektroosmotische Mobilität geringer, was sich durch die höhere Ionenstärke erklären läßt.

Im Unterschied zu den internen Standards weist der Ovalbumin-Peak (3) kein ausgeprägtes Tailing oder Leading auf. Die drei Hauptfraktionen (3a-c) werden im Ver-

gleich zu pH 8,4 besser getrennt, was jedoch auf die geringere Migrationsgeschwindigkeit der Analyten zurückzuführen ist. Vergleicht man die effektiven Mobilitäten der Fraktion 3c in beiden Meßreihen miteinander, ist zu konstatieren, daß niedrigere Werte bei pH 9,2 ermittelt werden. Da die Werte jedoch nicht auf einen kationischen Standard wie Neostigmin bezogen werden können, um mögliche Temperatureinflüsse auf die Viskosität zu eliminieren, läßt sich nicht feststellen, ob sich das Verhältnis von Ladung und Molekülradius verändert hat.

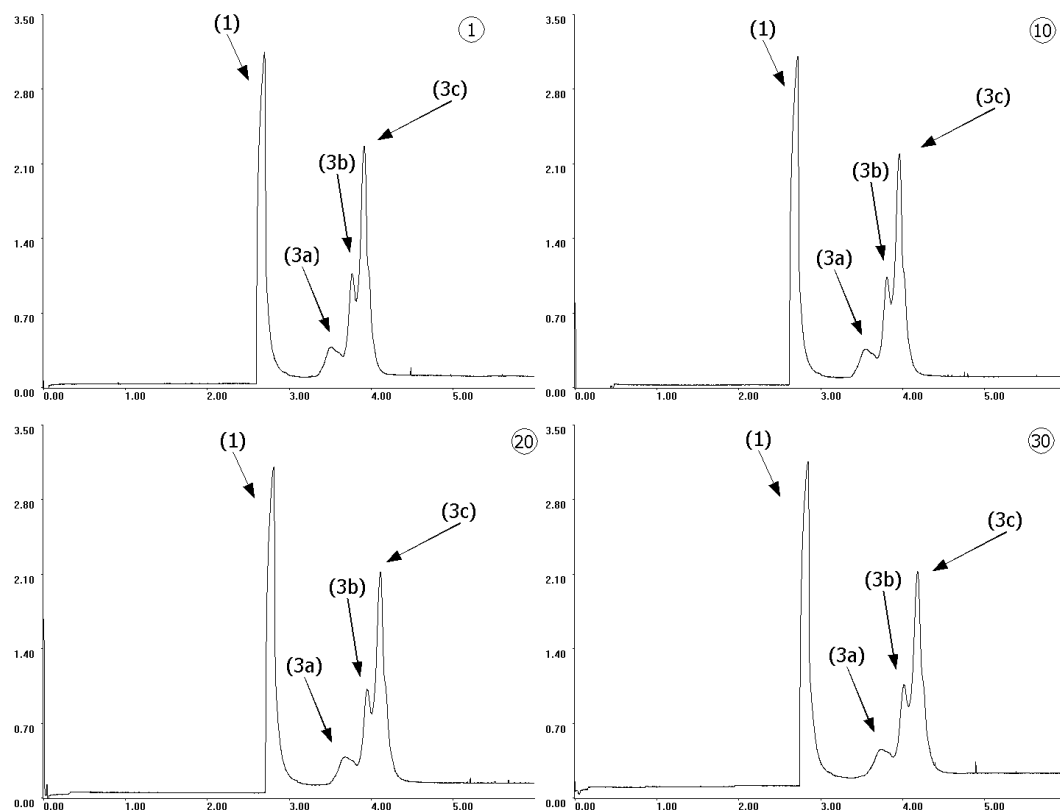


Abbildung 5.115: Ovalbumin ( $\sim 11$  ng pro Injektion; OVAL-290603)  
Borat-Puffer pH 9,2,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 38 \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 10, 20, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Die Ergebnisse sind für Ovalbumin in Tab. 5.8.1.6.2 zusammengefaßt und zeigen, daß die Meßwerte weniger schwanken als bei pH 8,4. Obwohl die Abweichungen vergleichbar mit denen des internen Standards sind, lassen sich keine Verbesserungen erzielen, indem die Flächenwerte zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Experiment	Substanz	$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\sigma}$	RSD %	$\bar{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Ovalbumin	4,048	4,012	4,085	0,101	2,503	0,01027
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	307,231	304,922	309,540	6,452	2,100	41,62861
korr. Fläche [AU]	Ovalbumin	75,922	75,176	76,669	2,086	2,747	4,35105

Tabelle 5.8.1.6.2: Ovalbumin, pH 9,2 (OVAL-290603)



Bei den abschließenden Kontrollversuchen lassen sich die Migrationszeiten deutlich besser reproduzieren ( $RSD\%=0,92\%$ ), lediglich bei den Peakflächen treten größere Schwankungen auf (s. Tab. 5.8.4.6.2), die durch einen Injektionsfehler verursacht werden. Ohne diesen liegen die relativen Standardabweichungen bei ca. 1,8%.

### 5.8.1.7 Diskussion der Teilergebnisse

Bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung von Ovalbumin treten im Vergleich zu den anderen Modellproteinen einige Unterschiede auf, die sich bereits bei den Ergebnissen der verwendeten internen Standards studieren lassen. Vergleicht man die einzelnen Meßwerte in einer graphischen Darstellung (s. Abb. 5.116), zeigt sich, daß oberhalb des IP von 5,2 ähnliche Schwierigkeiten durch Proteinadsorption auftreten.

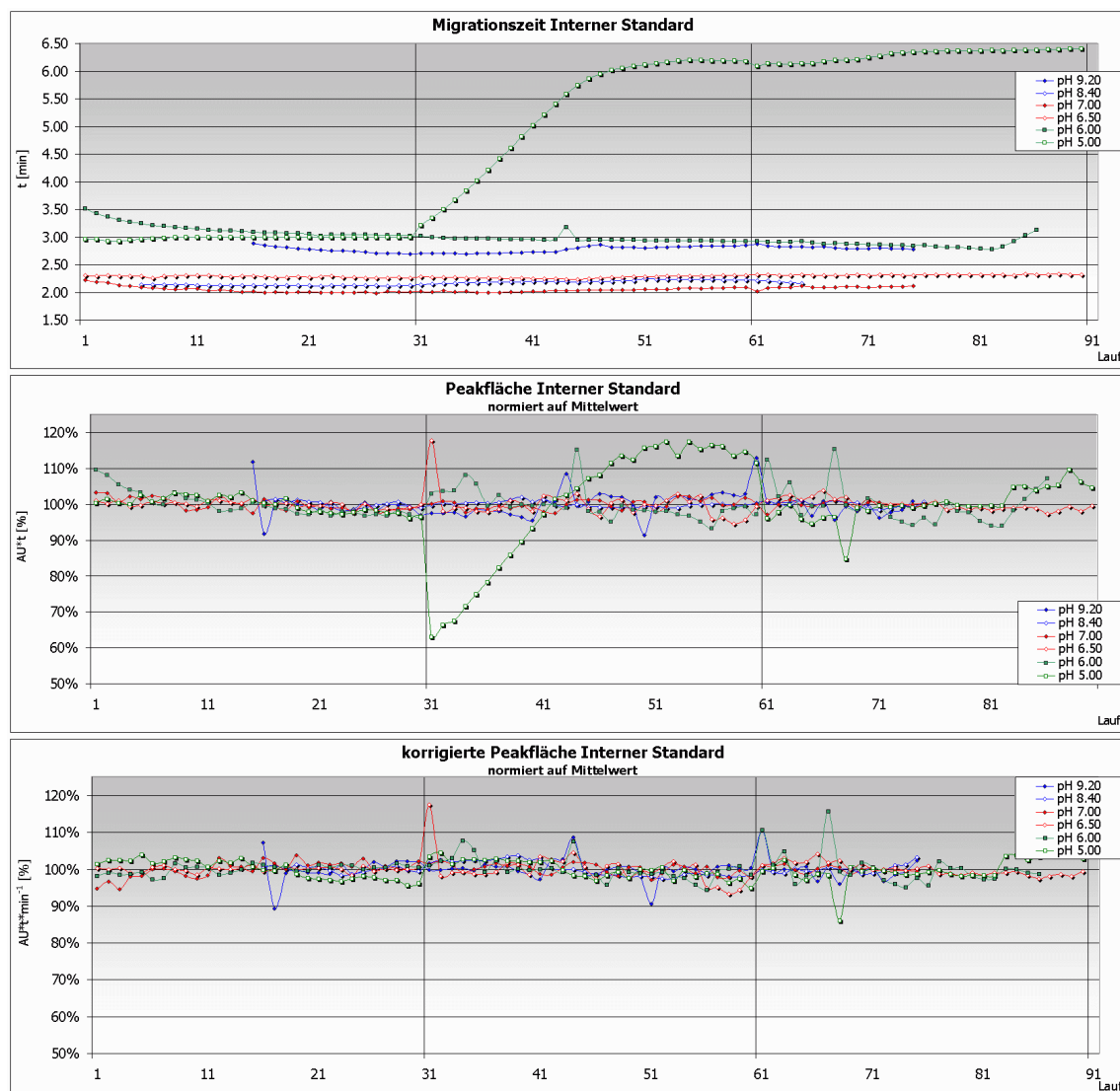


Abbildung 5.116: Ovalbumin interne Standards pH 5,0-9,2

Im Gegensatz dazu lassen sich die Migrationszeiten bereits bei pH 6,0 gut reproduzieren, auch wenn in den abschließenden Kontrollversuchen eine unerwartete Abnah-

me der Migrationszeiten beobachtet wird. Im gesamten pH-Bereich von 6,5 - 9,2 finden sich keine konkreten Hinweise dafür, daß es zu einer deutlich ausgeprägten Proteinadsorption kommt. Aufgrund der unterschiedlichen internen Standards, die verwendet wurden, lassen sich die absoluten Flächenwerte nur bedingt miteinander vergleichen. Das Streuen der AU-Werte bei pH 9,2 ist insofern untypisch für die Untersuchungen, läßt sich aber durch Integrationsfehler leicht erklären. Anhand der auf das jeweilige arithmetische Mittel normierten, korrigierten Peakflächen lassen sich die kritischen pH-Werte 5,0 und 6,0 leicht identifizieren, da hier einzelne Datenpunkt um mehr als 10% vom Mittelwert abweichen.

Aus den Werten der elektrophoretischen Mobilität lassen sich ähnliche Rückschlüsse auf das Adsorptionsverhalten von Ovalbumin ziehen. Bei den Untersuchungen im pH-Bereich von 6,5 bis 9,2 treten im Verlauf der Untersuchungen geringfügige Veränderungen des EOF auf, was sich auch im Balkendiagramm erkennen läßt. Sie lassen sich aber nicht eindeutig auf die Adsorption von Ovalbumin an der Kapillaroberfläche zurückführen, sondern werden vielmehr durch äußere Faktoren wie Temperaturschwankungen mit verursacht. Im Gegensatz dazu sind die Veränderungen bei pH 5,0 eindeutig auf die Wechselwirkungen von positiv geladenem Protein und negativ geladenem Kieselglas zurückzuführen.

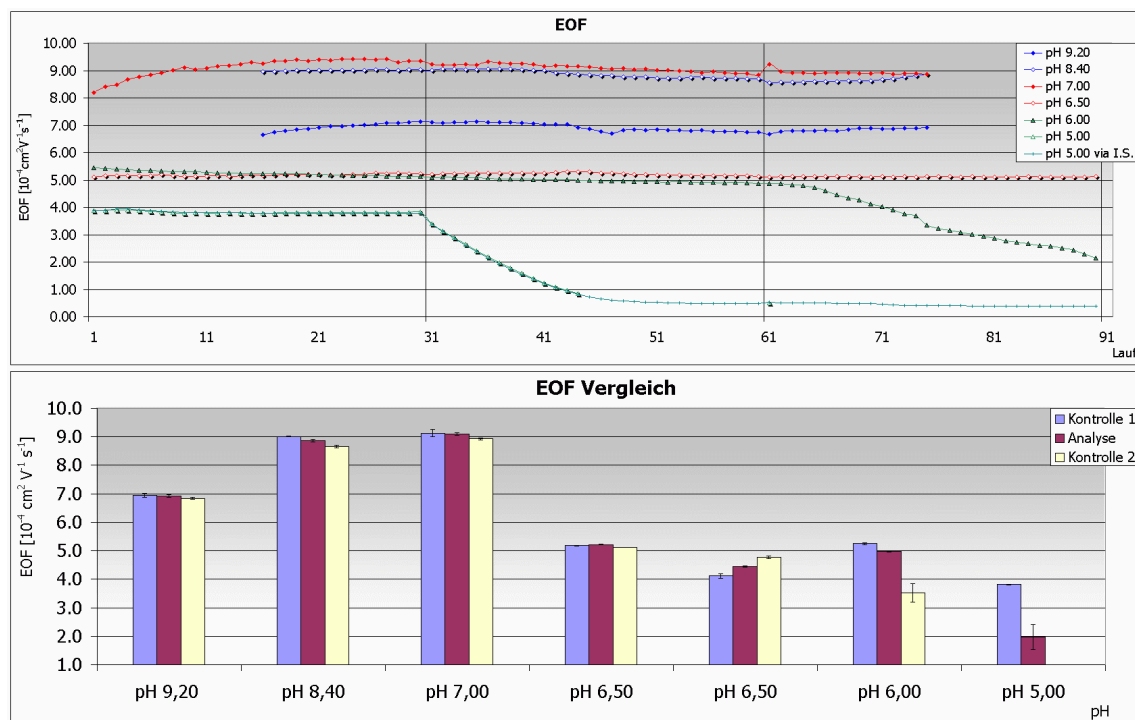


Abbildung 5.117: Ovalbumin; EOF im pH-Bereich 5,0-9,2

Außerdem zeigt die Meßreihe, daß die elektroosmotische Mobilität aus den Migrationszeiten des internen Standards abgeleitet werden kann, wenn dessen Nettomobilität bei den Kontrollversuchen zuvor bestimmt wird. Hingegen kann das unerwartete Einbrechen des EOF bei pH 6,0 während der zweiten Kontrollreihe nicht eindeutig erklärt werden. Aus diesem Grund werden weiterführende Untersuchungen durchgeführt (vgl. Kap. 5.2.8).

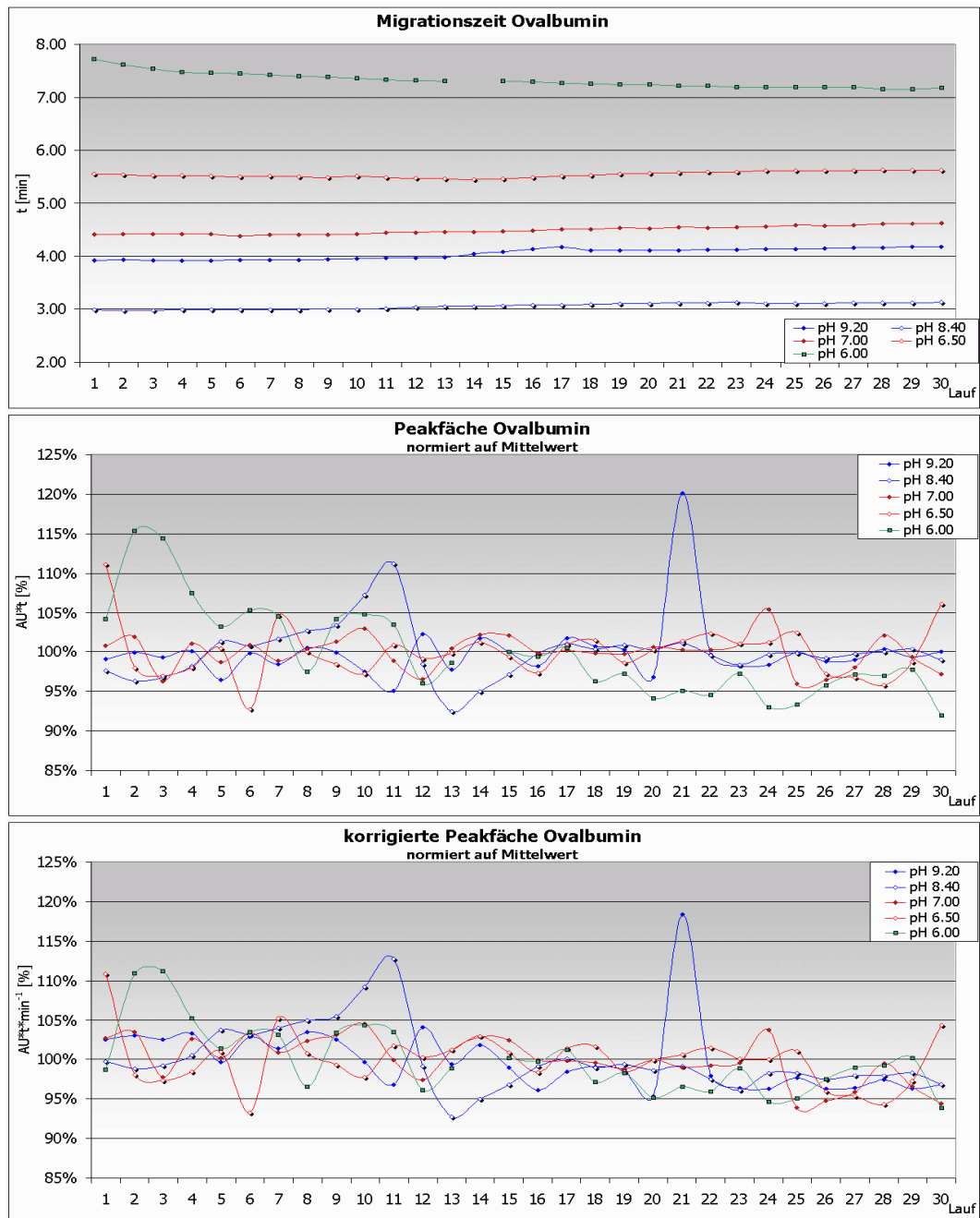


Abbildung 5.118: Ovalbumin pH 5,0-9,2; normiert auf Mittelwerte

Die graphische Auswertung von Ovalbumin zeigt, daß die Migrationszeiten des Proteins über den gesamten Bereich von pH 6,0 bis 9,2 für die jeweilige Meßreihe wei-

testgehend konstante Werte annehmen. Das ist insofern bemerkenswert, als daß bei allen anderen Modellproteinen bei pH-Werten in der Nähe des IP oder in alkalischer Lösung ausgeprägte Schwankungen oder Trends auftreten. Bei den in Abb. 5.118 gezeigten Meßergebnissen wird darauf verzichtet, die absoluten Werte der Flächen und korrigierten Flächen graphisch einander gegenüberzustellen. Wie die Untersuchungen bei pH 6,0 gezeigt haben (vgl. Kap. 1.1.4.2 und 5.8.1.2), hängen die absoluten Peakflächen deutlich von der Migrationsgeschwindigkeit des Analyten ab und erschweren eine anschauliche Darstellung. Zusätzlich werden die photometrischen Eigenschaften durch den pH-Wert beeinflußt, so daß sich die einzelnen Meßreihen besser miteinander vergleichen lassen, wenn die einzelnen Meßwerte auf das jeweilige arithmetische Mittel der Versuchsreihe normiert werden. Diese Procedere wird auch auf die korrigierten Peakflächen angewendet, auch wenn die Unterschiede hier nicht so groß sind wie bei den absoluten Peakflächen. Die Darstellungen zeigen, daß die Werte, bis auf einzelne Ausnahmen, im Intervall von 94-106% des Mittelwertes liegen. Lediglich bei pH 8,4 treten im Bereich der Läufe 10-15 noch nicht geklärte Fluktuationen auf. Wie in Kap. 5.8.1.2 bereits dargestellt, lassen sich die Schwankungen zu Beginn der Meßreihe bei pH 6,0 auf Unregelmäßigkeiten bei der Probeninjektion zurückführen. Allerdings zeigen die Versuchsreihen, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, daß die Einzelwerte im Bereich zwischen 92-116% liegen (vgl. Abb. 5.111). In Anbetracht des pH-Wertes, der lediglich 0,8 Einheiten über dem  $IP=5,2$  liegt, sind die Resultate positiv zu bewerten, da bei Cytochrom C, boviner Catalase und  $\beta$ -Lactoglobulin unter vergleichbaren Bedingungen Streuungen von über 30% RSD% beobachtet werden.

Das elektrophoretische Verhalten von Ovalbumin unterscheidet sich im pH-Bereich unterhalb des IP deutlich von dem, was bei den anderen Modellproteinen beobachtet wird. Das wirft die Frage nach den Ursachen für die abweichenden Eigenschaften auf. Um eine Erklärung zu erhalten, ist es notwendig, sich mit der Proteinstruktur auseinanderzusetzen. Als Grundlage dienen röntgenkristallographische Daten, obwohl sich die in der Datei (1OVA.pdb) gespeicherten Werte auf eine tetramere Struktur beziehen und in der Literatur von Monomeren bzw. Dimeren ausgegangen wird [141][142].

In Abb. 5.119 werden verschiedenen Darstellungsweisen der gleichen Quartärstruktur einander gegenüber gestellt. Während das Oberflächenpotential von Ovalbumin bei pH 7,0 in (1) dargestellt wird, zeigt die Struktur (2) die unterschiedlichen Proteinketten, die unterschiedlich eingefärbt sind.

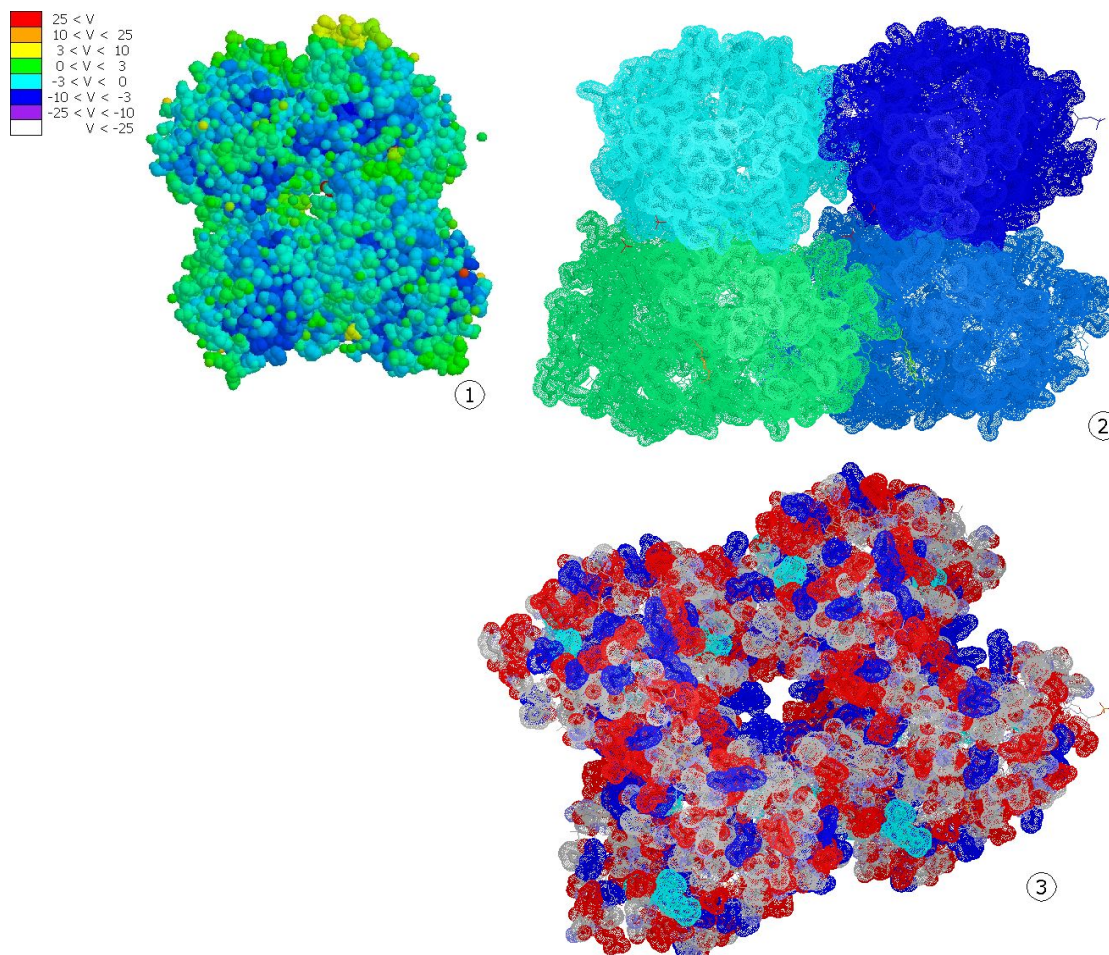


Abbildung 5.119: Ovalbumin Oberflächenpotential

Bei der dritten Version der Molekülstruktur sind die an der Oberfläche angeordneten Aminosäuren gemäß ihrer Ladung eingefärbt. Die basischen Reste von Lysin und Arginin sind rot dargestellt, während Histidin cyan und Asparagin- bzw. Glutaminsäure blau gezeichnet werden. Aufgrund der Darstellungen von (1) und (3) kann davon ausgegangen werden, daß die Ladungen gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt sind. Es existieren keine Bereiche, in denen bevorzugt basische Aminosäuren vorkommen, vielmehr lassen sich aufgrund des Überschusses an sauren Seitenketten Areale mit negativer Ladung ausmachen. Das an Asp<sup>293</sup> gebundene Kohlenhydratgerüst besteht bei der abgebildeten Kristallstruktur aus einem Disaccharid. Über die räumliche Anordnung dieses Restes in Lösung kann jedoch nur spekuliert werden

und ob bestimmte Areale abgeschirmt werden. Anhand der Gesamtstruktur lassen sich keine Bereiche ausmachen, die eine Wechselwirkung mit der negativ geladenen Kapillaroberfläche favorisieren würden. Dies würde zwar erklären, warum sich Ovalbumin relativ gut und reproduzierbar untersuchen läßt.

Die Peakform von Ovalbumin, die in allen Elektropherogrammen beobachtet wird, resultiert aus der Überlagerung der unterschiedlichen Fraktionen. Neben der Glykosylierung an Asp<sup>293</sup> trägt das unterschiedliche Phosphorylierungsmuster zur Ausbildung der posttranslational beobachteten Mikroheterogenität von Ovalbumin bei. Eine direkte Zuordnung der Peaks 3a-c zu den unterschiedlich stark phosphorylierten Formen ist zwar denkbar, berücksichtigt aber nicht die unterschiedlichen Konformere.

Ovalbumin gehört zur großen Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Diese weisen als wichtiges strukturelles Merkmal eine zentrale Schleife auf, die durch Serinproteasen wie Trypsin geschnitten wird. Der N-terminale Teil dieser Schleife wird anschließend als antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt in den zentralen Bereich des Proteins verlagert. Ovalbumin selbst ist kein Inhibitor von Serinproteasen, weist aber ebenfalls das typische, strukturelle Merkmal auf. Allerdings besitzt die Schleife einen  $\alpha$ -helikalen Bereich mit drei Windungen, die nach einer proteolytischen Spaltung nicht als Faltblatt inseriert werden. Zusätzlich kann bei der als I-Ovalbumin bezeichneten Form die intakte, strukturell variable Schleife in den Kernbereich des Proteins aufgenommen werden [140]. Diese Konformation wird auch als S-Ovalbumin bezeichnet und zeichnet sich durch größere thermische Stabilität aus. Da das Gerinnen von Eiweiß durch einen hohen Anteil von S-Ovalbumin beeinträchtigt wird, ist dieses Konformer für die Lebensmittelindustrie von großem Interesse. Neben thermischen Einflüssen führen auch hohe elektrische Feldstärken, wie sie bei der Pasteurisierung von Vollei eingesetzt werden, zur Bildung von S-Ovalbumin.

Aus diesen Gründen ist es äußerst schwierig, die beobachteten Fraktionen einer bestimmten Proteinstruktur zuzuordnen. Neben dem Glykosylierungs- und Phosphorylierungsmuster existieren zum einen unterschiedliche, stabile Isomere, die zum anderen durch Serinproteasen bei der Aufarbeitung des Rohmaterials in strukturell ähnliche Abbauprodukte umgewandelt werden können.

Darüber hinaus wird in verschiedenen Arbeiten beschrieben, daß sich in alkalischen Puffern Borat Komplexe mit den Kohlenhydratseitenkette des Ovalbumins eingeht

und so zur Bildung von weiteren Proteinformen führen, die sich aufgrund der höheren Ladungszahl besser voneinander trennen lassen [57][144]. Dieses Phänomen konnte bei den Untersuchungen nicht beobachtet werden.

### 5.8.2 Dialyse Ovalbumin

Die in Kapitel 5.8.1.2 beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß bei den jeweils abschließenden Kontrollversuchen ein noch ungeklärter Abfall der elektroosmotischen Mobilität auftritt. Da sich dieses Phänomen in drei, voneinander unabhängig durchgeführten Meßreihen auftritt, lassen sich zufällige Fehler und äußere Einflüsse wie Temperaturschwankungen und Verunreinigungen ausschließen. Die Abnahme der elektroosmotischen Mobilität kann unterschiedliche Gründe haben. Aus Gl. 28 (aus [19], vgl. auch Kap. 1.4.4) geht hervor, daß  $\mu_{\text{EOF}}$  von der Dielektrizitätskonstanten der Lösung, deren Viskosität und dem  $\zeta$ -Potential abhängt.

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{4\pi \cdot \eta} \approx \frac{\sigma}{4\pi \cdot \eta \cdot \kappa} ; \quad \sigma = \sqrt{8 \cdot k \cdot T \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \eta} \sinh\left(\frac{z \cdot e_0 \cdot \zeta}{2 \cdot k \cdot T}\right) \quad (\text{Gl. 28}).$$

- $\sigma$ :     Ladungsdichte der Kapillaroberfläche [ $\mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
- $T$ :     Temperatur [K]
- $k$ :     Boltzmann-Konstante [ $1,38065 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ]
- $\epsilon_0$     Dielektrizitätskonstante des Vakuums [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
- $\epsilon_r$     relative Dielektrizitätskonstante [ $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ ]
- $\eta$      kinematische Viskosität [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]
- $z_i$ :    Ladungszahl der Spezies  $i$
- $e_0$ :    Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$ ]
- $\zeta$      Zetapotential o.H.p. [mV]

Da sich die Zusammensetzung des Puffers während der Messungen nur unwesentlich verändert und Temperaturschwankungen gleichfalls ausgeschlossen werden können, sind die beobachteten Veränderungen auf Fluktuationen des  $\zeta$ -Potentials bzw. der Ladungsdichte auf der Kapillaroberfläche zurückzuführen. Diese Veränderungen müssen in direktem Zusammenhang mit Ovalbumin gesehen werden, da vergleichbare Beobachtungen bei anderen Modellproteinen nicht gemacht werden. Daher konzentrieren sich die Überlegungen auf das Protein selbst, und auf Zusätze, die Ovalbumin vor dem Lyophilisationsprozeß zugesetzt werden.

Bei den Zusätzen, die Proteinen bei der Gefriertrocknung zugesetzt werden, handelt es sich um verschiedene Zucker, Aminosäuren, Amine, Polyole und Salze der Hofmeister-Serie mit taxigenen Eigenschaften [131][145], die allesamt nicht UV-aktiv



sind. Diese Substanzen sollen einerseits Wassermoleküle von der Proteinoberfläche verdrängen und die native Proteinstruktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisieren. Gleichzeitig soll verhindert werden, daß bei der Lyophilisation Kristallisationsprozesse ablaufen [146], welche sogar auf der Ebene der Sekundärstruktur zu Veränderungen führen können, wobei der Anteil von  $\alpha$ -helikalen Elementen an der Gesamtstruktur zugunsten von  $\beta$ -Faltblatt-Bereichen verschoben wird [147][148]. Dieser Prozeß kann durchaus reversibel sein, so daß nach der Rekonstitution das native Protein vorliegt.

Bei der Untersuchung des möglichen Einflusses von Lyophilisationszusätzen besteht das Hauptproblem darin, daß diese Substanzen über kein Chromophor verfügen und somit nicht direkt in den Elektropherogrammen detektiert werden können. Deshalb muß eine andere Vorgehensweise gewählt werden, um die Auswirkungen der Kryoprotektanten auf die Proteinadsorption studieren zu können.

Um mögliche Unterschiede im Adsorptionsverhalten von Ovalbumin erkennen zu können, wird die Protein-Lösung vor Gebrauch 24 Stunden gegen eine isotonische Kochsalzlösung dialysiert, wobei die Trennschärfe des Dialyseschlauches 5 kDa beträgt (MWCO: mean molecular weight cut off; vgl. Kap. 7.5). Durch die Maßnahme werden niedermolekulare Begleitsubstanzen entfernt, welche die Stabilität der Proteinstruktur verändern. Um gleichzeitig sicher stellen zu können, daß möglicherweise auftretende Adsorptionsprozesse nicht durch die Denaturierung des Proteins während der Dialyse verursacht werden, wird die Lösung parallel bei pH 6,5 untersucht. Zusätzlich wird in einer weiteren Versuchsreihe eine Ovalbumin-Lösung bei pH 6,5 untersucht, die zuvor 36 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert worden ist, um zu sehen, wie sich durch Abbauprozesse verändertes Ovalbumin verhält.

### **5.8.2.1 Untersuchungen bei pH 6,0**

Das in Kapitel 5.2.1 beschriebene Modell zur Untersuchung von Proteinen wird auch bei den Versuchsreihen mit dialysierter Proteinlösung angewendet. Als Hintergrundelektrolyt wird ein 50 mM Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 verwendet (s. Kap. 9.10.1 und 9.10.2). Zu Versuchsbeginn wird die Systempräzision aus jeweils 30 Messungen bestimmt. Die Ergebnisse für Acetanilid sind in Tab. 5.8.2.1.1 zusammengefaßt. Die in beiden Versuchsreihen beobachteten Schwankungen sind darauf zurückzuführen, daß zu Beginn der Messungen die Gleichgewichtsprozesse im Bereich



der Helmholtz-Schicht noch nicht abgeschlossen sind und durch die Veränderung des  $\zeta$ -Potentials zu den Schwankungen führen. Zusätzlich werden die Integrationsergebnisse durch Schwankungen der Basislinie bei der Meßreihe D-OVAL-230904 beeinflusst, was die relativ großen Werte für die RSD% erklärt. Diese beschränken sich aber auf die ersten 10 Läufe, so daß die Meßwerte bei den Läufen 11-30 deutlich weniger streuen.

pH 6,0		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
D-OVAL-230904		Systempräzision						
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	4,774	4,704	4,845	0,197	4,127	0,03882
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	32,599	31,637	33,560	2,687	8,242	7,21857
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	6,857	6,571	7,142	0,799	11,650	0,63804
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,028	3,970	4,086	0,162	4,030	0,02635
D-OVAL-230904		Experiment						
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	6,082	5,062	7,101	2,850	46,858	8,12086
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	53,491	39,136	67,845	40,114	74,993	1609,15151
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,245	7,696	8,794	1,534	18,607	2,35380
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,630	3,241	4,018	1,087	29,941	1,18103
D1-OVA-150505		Systempräzision						
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	5,218	5,163	5,273	0,153	2,930	0,02338
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	44,701	43,990	45,411	1,986	4,442	3,94249
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,568	8,457	8,678	0,309	3,608	0,09558
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,683	3,644	3,721	0,107	2,917	0,01154
D1-OVA-150505		Experiment						
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	4,996	4,616	5,377	1,063	21,279	1,13041
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	42,607	39,255	45,958	9,366	21,983	87,72581
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	8,521	8,412	8,631	0,307	3,597	0,09398
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	3,964	3,750	4,178	0,598	15,082	0,35743

Tabelle 5.8.2.1.1: Ovalbumin – Untersuchungen nach Dialyse; Systempräzision bei pH 6,0 EOF-Marker  
Bei der Untersuchung der dialysierten Ovalbumin-Lösung zeigen sich in beiden Meßreihen deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen, die in Kapitel 5.8.1.2 beschrieben werden. Stellvertretend sind einige Elektropherogramme der Reihe D1-OVA-150505 in Abb. 5.120 zusammengefaßt. Zunächst fällt auf, daß sich das Peakmuster während der Messungen deutlich verändert. Zum einen beobachtet man ab dem 23. Lauf eine deutliche Zunahme der Migrationszeiten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2), zum anderen eine deutlich ausgeprägte Veränderung des Ovalbumin-Peaks (3).

Neben den drei Hauptfraktionen (3a-c), die auch in den anderen Meßreihen beobachtet werden, ist die Schulter auf der rechten Seite von 3c deutlicher zu erkennen. Mit abnehmender elektroosmotischer Mobilität nimmt die Trennleistung des Systems deutlich zu, so daß in Lauf 28 vier Ovalbumin-Peaks detektiert werden. Die Abnahme des EOF führt dazu, daß das Protein im letzten Lauf der Versuchsreihe nur noch teilweise detektiert werden kann.

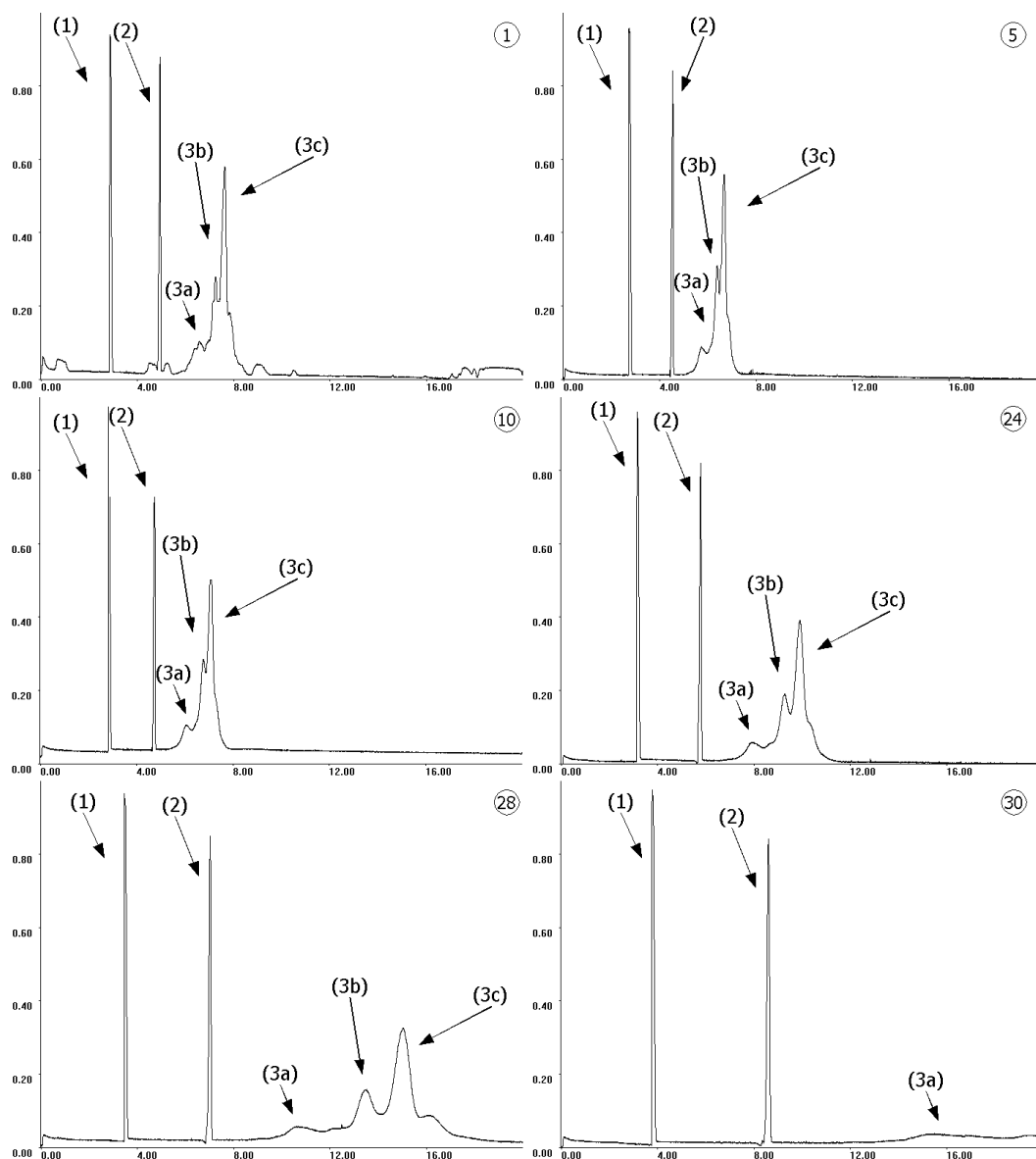


Abbildung 5.120: Ovalbumin ( $\sim 9$  ng pro Injektion; D1-OVAL-150505)  
Phosphat-Puffer pH 6,0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $U=25 \text{ kV}$ ,  $I \sim 47 \text{ } \mu\text{A}$ ; Läufe 1, 5, 10, 24, 28, 30  
(1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Die statistische Auswertung beider Meßreihen zeigt, daß sich die relative Standardabweichung aller relevanten Meßgrößen von internem Standards und EOF-Marker im Vergleich zu den vorausgegangenen Kontrollmessungen vervielfacht. Die Schwankungen sind nicht gleichmäßig über den gesamten Untersuchungszeitraum verteilt, sondern treten in beiden Versuchsreihen erst ab einer bestimmten Anzahl von Läufen auf. Dieser Zeitpunkt ist jedoch unterschiedlich.

Die Ergebnisse von Ovalbumin sind in Tab. 5.8.2.1.2 zusammengefaßt. Die gemessenen Schwankungen sind im Vergleich zu den nicht dialysierten Proteinlösungen viel größer und lassen zwei Rückschlüsse zu. Entweder zersetzt sich das Protein während der Dialyse teilweise und verursacht dadurch den Zusammenbruch des EOF oder die

zur Stabilisierung zugesetzten Kryoprotektanten fehlen, um die Quartärstruktur von Ovalbumin während der Untersuchungen zu stabilisieren.

pH 6,0		Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
D-OVAL-230904		Experiment						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Ovalbumin	7,264	6,213	8,314	2,570	35,380	6,60410
Fläche	[AU·min]	Ovalbumin	143,701	121,489	165,913	54,351	37,822	2953,98129
korr. Fläche	[AU]	Ovalbumin	19,823	18,911	20,736	2,233	11,265	4,98699
D1-OVA-150505		Experiment						
$t_{\text{Mig}}$	[min]	Ovalbumin	7,939	6,881	8,996	2,955	37,223	8,73235
Fläche	[AU·min]	Ovalbumin	180,697	160,336	201,058	56,900	31,489	3237,60243
korr. Fläche	[AU]	Ovalbumin	24,691	22,378	27,004	6,464	26,178	41,77851

Tabelle 5.8.2.1.2: Ovalbumin Dialyse, pH 6,0 (Serien D-OVAL-230904 u. D1-OVAL-150505)

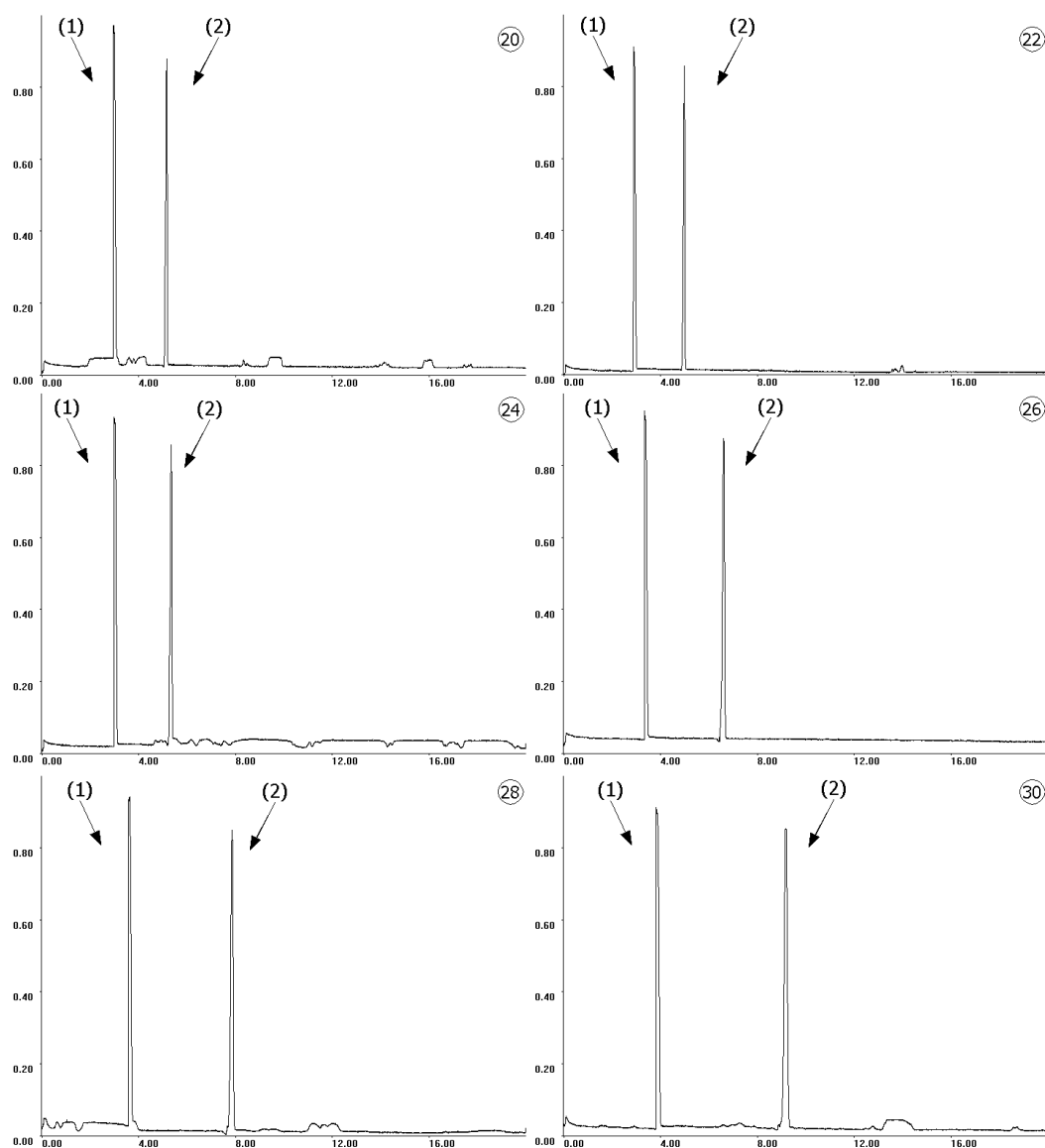


Abbildung 5.121: System-Test 2 (D1-OVAL-150505)  
Phosphat-Puffer pH 6,0, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 47 µA; Läufe 20, 22, 24, 26, 28, 30  
(1) Neostigmin und (2) Acetanilid

Bei den abschließenden Kontrollversuchen beobachtet man ein merkwürdiges Verhalten von Neostigmin (1) und Acetanilid (2). In beiden Meßreihen nimmt die Migrati-

ongeschwindigkeit beider Analyten während der ersten 15-20 Messungen kontinuierlich zu (s. Abb. 5.123), wobei die Effekte viel zu groß sind, als daß sie durch äußere Faktoren verursacht werden könnten. Das interessanteste Phänomen ist jedoch, daß die Migrationszeiten bei beiden Meßreihen um den 20. Lauf herum erneut einbrechen (vgl. Abb. 5.121). Der beobachtete Anstieg ist vergleichbar mit den Beobachtungen, die ohne vorausgegangene Dialyse beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen vor allem, daß die Reproduzierbarkeit der Messungen durch die Dialyse deutlich beeinträchtigt wird und daß die Schwankungen durch mehrere, zeitlich versetzt ablaufende Prozesse verursacht werden. Um diese genauer charakterisieren zu können, müssen sie mit den Ergebnissen von weiteren Untersuchungen verglichen werden.

### **5.8.2.2 Untersuchungen bei pH 6,5**

Um die unerwarteten Ergebnisse von Ovalbumin bei pH 6,0 richtig interpretieren zu können, wird Ovalbumin in isotonischer Kochsalzlösung solvatisiert und anschließend bei unterschiedlichen Bedingungen dialysiert. Während dies für die Untersuchungen in Reihe D-OVAL-131004 bei Raumtemperatur und über 36 Stunden geschieht, wird in Reihe D2-OVA-150505 bei 4°C gearbeitet und die Proteinlösung nach 24 Stunden untersucht. Gleichzeitig wird die Systempräzision in 30 Kontrollversuchen ermittelt, wobei diese bereits parallel zum Ende der Dialyse durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei pH 6,0 treten bei pH 6,5 keine nennenswerten Schwankungen der Migrationszeiten oder Peakflächen auf, wie die in Tab. 5.8.2.2.1 zusammengefaßte Auswertung von Acetanilid belegt.

Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten Proteinuntersuchung unterscheiden sich grundlegend. Man beobachtet in beiden Fällen keine Abnahme der elektroosmotischen Mobilität, so daß die Migrationszeiten der Analyten konstant bleiben. Allerdings sind die Unterschiede in den Elektropherogrammen deutlich zu erkennen. Bei der Ovalbumin-Lösung, die bei Raumtemperatur vorbehandelt wurde, ist ein starkes Rauschen der Basislinie zu erkennen. Zusätzlich ist der Proteinpeak deutlich kleiner als in den Elektropherogrammen, die in Abb. 5.122 dargestellt sind. Die gezeigten Läufe stammen aus der Untersuchung der bei 4°C dialysierten Lösung.

pH 6,5	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
D-OVAL-131004 Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,816	3,800	3,832	0,045	1,173	0,00200
Fläche [AU·min]	Acetanilid	26,430	26,292	26,568	0,385	1,457	0,14830
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	6,926	6,904	6,949	0,063	0,903	0,00391
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,032	5,011	5,053	0,059	1,168	0,00345
D-OVAL-131004 Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	3,783	3,744	3,822	0,109	2,874	0,01182
Fläche [AU·min]	Acetanilid	19,389	17,967	20,812	3,975	20,501	15,79998
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	5,118	4,761	5,475	0,997	19,482	0,99416
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,079	5,026	5,132	0,147	2,892	0,02158
D2-OVA-150505 Systempräzision							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,373	4,362	4,384	0,030	0,689	0,00091
Fläche [AU·min]	Acetanilid	35,140	34,929	35,351	0,590	1,678	0,34774
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	8,035	7,997	8,073	0,105	1,310	0,01107
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,391	4,380	4,401	0,030	0,682	0,00090
D2-OVA-150505 Experiment							
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,365	4,360	4,370	0,014	0,325	0,00020
Fläche [AU·min]	Acetanilid	34,935	34,774	35,096	0,451	1,290	0,20317
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	8,003	7,970	8,037	0,094	1,177	0,00887
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	4,399	4,393	4,404	0,014	0,327	0,00021

Tabelle 5.8.2.2.1: Ovalbumin – Untersuchung von dialysierter Lösung, pH 6,5, EOF-Marker

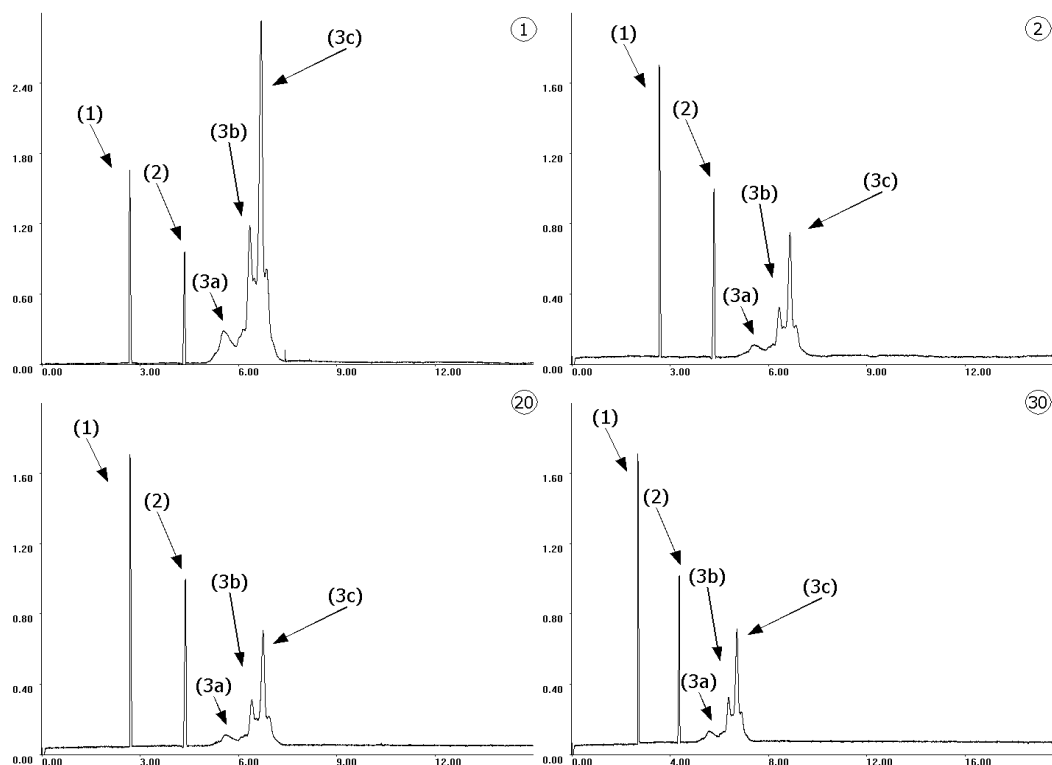


Abbildung 5.122: Ovalbumin (~ 9 ng pro Injektion; D2-OVAL-150505)  
 Phosphat-Puffer pH 6,5, 50 mmol·l<sup>-1</sup>, U=25 kV, I ~ 59μA; Läufe 1, 2, 10, 30  
 (1) Neostigmin, (2) Acetanilid und (3) Ovalbumin

Das starke Rauschen der Basislinie ist darauf zurückzuführen, daß die Ovalbumin-Lösung eine Vielzahl von Abbauprodukten enthält, die sehr unterschiedliche, effektive Mobilitäten aufweisen. Allerdings zeigen diese keine nennenswerte Tendenz, an der

Oberfläche der Kapillare zu adsorbieren und dadurch den EOF zu verändern. Im Gegensatz dazu ist das Peakmuster der Reihe D2-OVA-150505 sehr gut reproduzierbar und weist im Vergleich zu den Untersuchungen der nicht dialysierten Lösung nur minimale Unterschiede auf. Von Bedeutung ist die Größe des Ovalbumin-Peaks im ersten Lauf, da die Fläche um etwa 350% größer ist als in den anderen Läufen. Daß es sich dabei um keinen Injektionsfehler handelt, läßt sich daran erkennen, daß die Peakflächen von Neostigmin (1) und Acetanilid (2) keine Veränderungen zu den nachfolgenden Elektropherogrammen aufweisen.

pH 6,5	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
D-OVAL-131004	Experiment						
t <sub>Mig</sub> [min]	Ovalbumin	5,554	5,493	5,615	0,165	2,976	0,02733
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	37,821	29,752	45,891	21,787	57,604	474,65546
korrr. Fläche [AU]	Ovalbumin	6,798	5,339	8,258	3,940	57,962	15,52627
D2-OVAL-150505	Experiment						
t <sub>Mig</sub> [min]	Ovalbumin	6,715	6,705	6,725	0,028	0,411	0,00076
Fläche [AU·min]	Ovalbumin	183,888	145,713	222,063	106,681	58,014	11380,8567
korrr. Fläche [AU]	Ovalbumin	27,396	21,683	33,109	15,965	58,274	254,87961

Tabelle 5.8.2.2.2: Ovalbumin Dialyse, pH 6,5 (Serien D-OVAL-131004 u. D2-OVAL-150505)

Durch diesen Ausreißer erklären sich auch die in Tab. 5.8.2.2.2 zusammengefaßten Resultate der statistischen Auswertung. Der sehr gut reproduzierbaren Migrationszeit stehen sehr große RSD%-Werte der Flächen und korrigierten Peakflächen gegenüber, die durch den ersten Lauf verursacht werden. Läßt man die Werte der Läufe 1 und 29 (Integrationsfehler) für die Auswertung unberücksichtigt, reduzieren sich die Schwankungen auf ca. 3,2% RSD%.

Die in Meßreihe D-OVAL-131004 gemessenen Streuungen werden nicht durch einzelne Ausreißer verursacht, sondern sind die Konsequenz der insgesamt schlecht reproduzierbaren Einzelwerte. Bei den abschließenden Kontrollversuchen treten keine Veränderungen zu den vorausgegangenen Proteinuntersuchungen auf. Während in der Versuchsreihe D-Oval-131004 die RSD%-Werte der Peakflächen/korrigierten Peakflächen bei über 30% liegen, betragen in der anderen Meßreihen 0,67-1,17%.

### 5.8.2.3 Diskussion der Teilergebnisse

Die Untersuchungen von dialysierter Ovalbumin-Lösung zeigen deutlich, daß die Probleme bei der Reproduzierbarkeit eindeutig vom pH-Wert des Hintergrundelektrolyten abhängen. In den Meßreihen D1-OVA-150505 und D2-OVA-150505 wird dieselbe dialysierte Proteinlösung verwendet und bei pH 6,0 respektive 6,5 untersucht. Bei pH

6,5 sind die Werte aller relevanten Meßgrößen wie  $t_{\text{Mig}}$ ,  $\mu_{\text{EOF}}$ , AU und korr. AU über den gesamten Zeitraum von 90 Läufen hinweg sehr konstant. Im Gegensatz dazu verändern sich die Parameter bei der Untersuchung bei pH 6,0 plötzlich und massiv. Ein Abbau des Ovalbumins durch Hydrolyse, Deamidierung oder Oxidation kann ausgeschlossen werden, da in der Reihe D1-OVA-150505 bei pH 6,0 die typischen Spikes nicht beobachtet werden. Diese Feststellung wird gleichzeitig durch die Untersuchung der dialysierten Proteinlösung in Reihe D-OVAL-131004 bei pH 6,5 abgesichert, welche das kapillarelektrophoretische Verhalten einer durch Zersetzungsprozesse veränderten Proteinlösung beschreibt.

Die Versuchsreihe D2-OVA-150505 bei pH 6,5 zeigt, daß die Adsorptionseigenschaften des Proteins nicht durch die Abwesenheit von Kryoprotektanten beeinflusst werden. Insbesondere die sehr große Übereinstimmung des Peakmusters mit den Elektropherogrammen, die mit nicht dialysierter Ovalbumin-Lösung erhalten werden, unterstreicht diese Erkenntnis.

Die Schwierigkeiten, welche durch die Proteinadsorption verursacht werden, sind auf pH-Werte von 6,0 und niedriger beschränkt. Die unterschiedlichen Resultate, die mit dialysierter und nicht dialysierter Lösung erhalten werden, lassen sich auf die Anwesenheit der als Kryoprotektanten verwendeten Zusätze zurückführen. Der plötzlich und reproduzierbare auftretende Anstieg der Migrationszeiten bzw. Abfall des EOF (vgl. Abb. 5.110, 5.123 und 5.124) läßt sich so erklären, daß ein Teil des Ovalbumins an der Kapillaroberfläche adsorbiert. Die Proteinstruktur wird in Gegenwart von Zusätzen soweit stabilisiert, so daß ein Spreiten des Makromoleküls verhindert und das  $\zeta$ -Potential dadurch nur wenig verändert wird. Werden die Stabilisatoren durch Spülprozesse ausgewaschen oder durch Dialyse entfernt, liegt Ovalbumin in einer metastabilen Konformation vor [140], die offensichtlich spontan denaturiert, und dabei größere Areale der Kapillaroberfläche abdeckt.

Wenn dies geschieht, kommt es zu einer deutlichen Abnahme des EOF, wie sie bei allen Untersuchungen bei pH 6,0 beobachtet wird, unabhängig davon, ob die Proteinlösung zuvor dialysiert wurde oder nicht. Die Zunahme der elektroosmotischen Mobilität bzw. die Abnahme der Migrationszeiten, die zu Beginn der zweiten Kontrollserie beobachtet wird (s. Abb. 5.123 u. 5.124), läßt sich dadurch erklären, daß ein Teil des adsorbierten, aber noch desorbierbaren Proteins ausgewaschen wird. Nach etwa 20

Läufen fällt der EOF erneut ab, was auf einer weiteren Veränderung des noch an der Oberfläche haftenden Ovalbumins oder eine chemische Veränderung der Plaques zurückzuführen ist.

Bei den Ergebnissen des verwendeten internen Standards ist der Verlauf der korrigierten Peakflächen bemerkenswert. Mit Ausnahme einer Meßreihe bei pH 6,5 streuen die korr. AU-Werte nur geringfügig, trotz der teilweise deutlich schwankenden Migrationsgeschwindigkeiten. Bei der Meßreihe D-OVAL-131004 hingegen beobachtet man keine ausgeprägten Schwankungen der Migrationszeiten, dafür fluktuieren die Einzelwerte der korrigierten Peakflächen zwischen 5 und 180% des Mittelwertes.

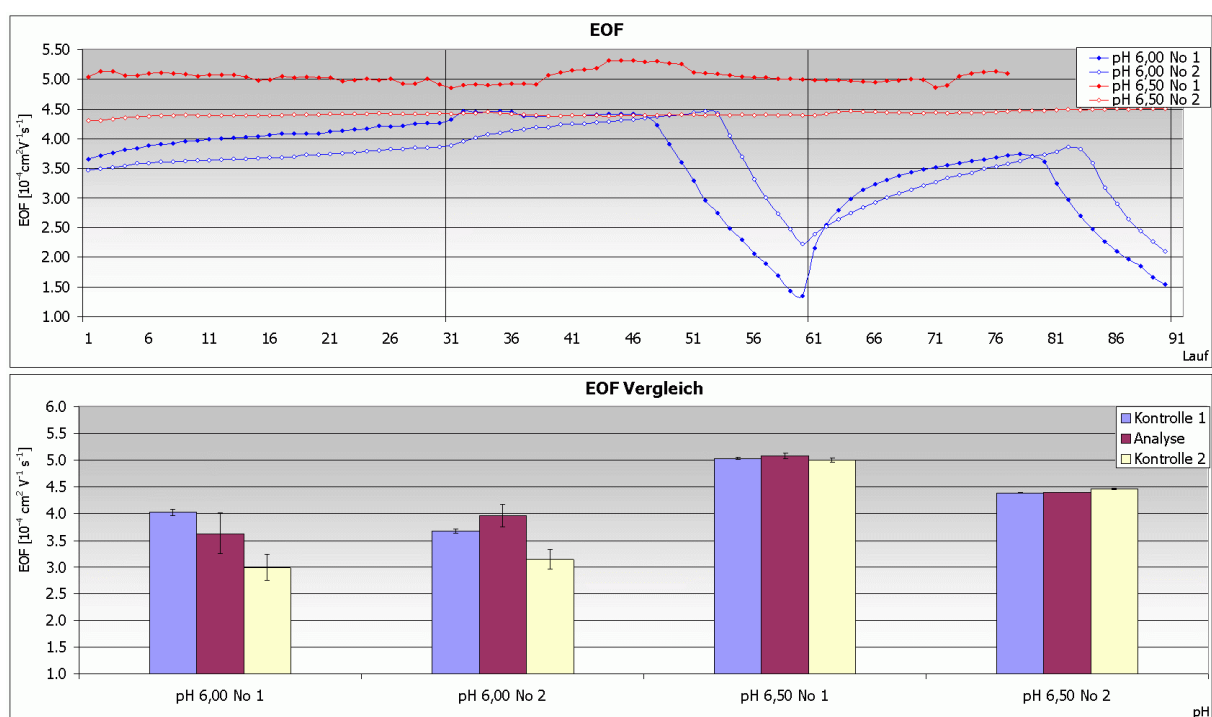


Abbildung 5.123: Dialyse von Ovalbumin; EOF Ergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse für den EOF, der bei den Untersuchungen gemessen wird, stellt man fest, daß die Ergebnisse des Balkendiagramms gut mit der graphischen Darstellung der Einzelwerte übereinstimmen und die deutlichen Unterschiede zwischen den drei Teilabschnitten jeder Versuchsreihe darstellen.



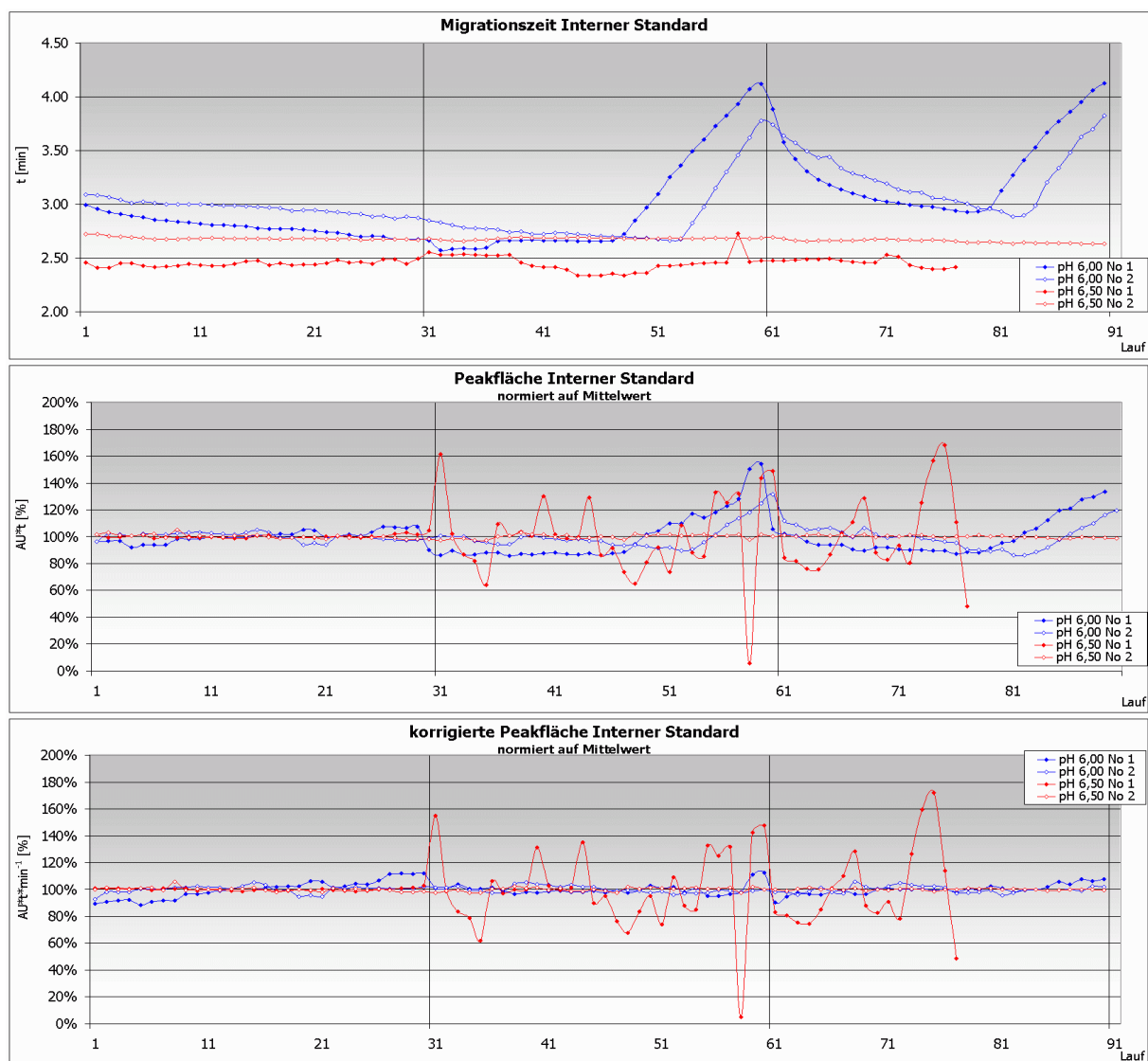


Abbildung 5.124: Dialyse von Ovalbumin; Neostigmin Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Meßergebnisse von Ovalbumin erfolgt in Abb. 5.125 und zeigt die deutlichen Unterschiede zwischen den Meßreihen. Während bei pH 6,0 die Meßwerte ab einem bestimmten Zeitpunkt deutliche Veränderungen erfahren, läßt sich der Einfluß der Proteinzerersetzung auf die Meßwerte bei pH 6,5 deutlich an den immensen Schwankungen der normierten Werte beobachten. Im Unterschied dazu zeigt die zweite Reihe bei pH 6,5 kaum Schwankungen bis auf den 1. und 29. Lauf. Während die Ursache für den Ausreißer am Beginn der Untersuchungen nicht geklärt ist, begründet sich der zweite abweichende Wert auf einen Integrationsfehler.

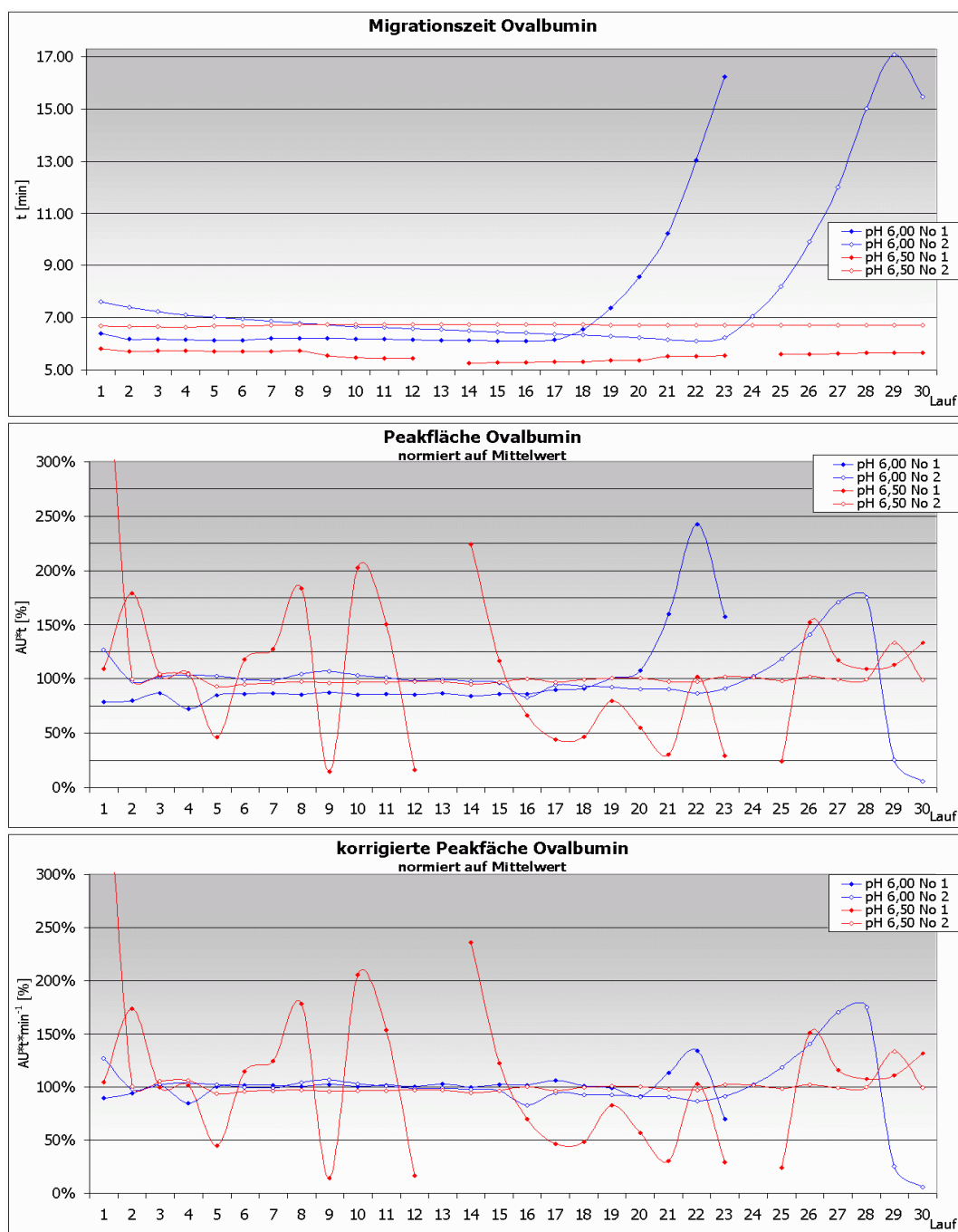


Abbildung 5.125: Dialyse von Ovalbumin; Ergebnisse normiert auf Mittelwerte

Die Untersuchungen zeigen, daß der mögliche Einfluß von Zusätzen aus dem Gefrier-trocknungsprozeß nicht unterschätzt werden darf. Diese werden eingesetzt, um eine irreversible Konformationsänderung der Proteine zu verhindern, die durch die Entfernung von Wassermolekülen aus der direkten Umgebung des Proteins ausgelöst wird. Andererseits kommt es zu Strukturveränderungen, in deren Verlauf Aminosäuren aus dem Kernbereich an die Oberfläche gelangen und dort im ungünstigsten Fall mit anderen Molekülen reagieren. Die daraus entstehenden Assoziate sind entweder nicht mehr in Wasser löslich oder weisen eine nicht-native Konformation auf [131].

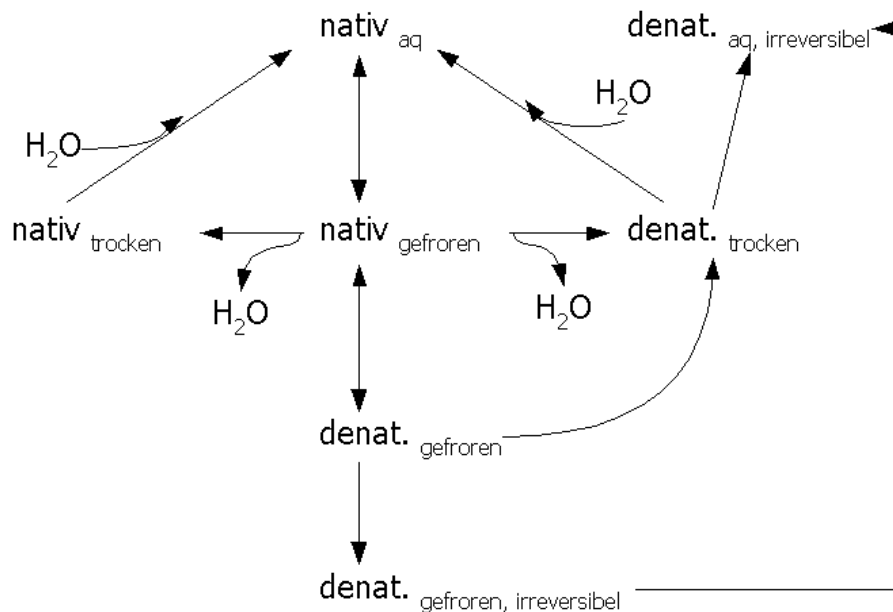


Abbildung 5.126: Schema der Gefriertrocknung von Proteinen; aus [145]

Das in Abb. 5.126 gezeigte Schema der Gefriertrocknung zeigt die möglichen Prozesse, die bei der Lyophilisation ablaufen können. Durch den Einsatz von Kryoprotektanten soll der Anteil an irreversibel verändertem Protein möglichst gering gehalten werden, indem das Protein in einem lokalen Minimum der inneren Energie stabilisiert wird [106]. Bei Enzymen, die als Katalysatoren in nicht-wässrigen Lösungen eingesetzt werden sollen, ist man bemüht, das Protein in einer kompakteren, noch nativen Konformation zu konservieren. Da auch im festen, dehydratisierten Zustand die Tertiär-/Quartärstruktur einen dynamischen Zustand darstellt, werden die Kryoprotektanten so gewählt, daß auch die Konformationsübergänge im festen Zustand möglichst auf ein Minimum reduziert werden [107].

Unterstellt man, daß die Lyophilisationszusätze auch im Fall von Ovalbumin die Makromoleküle in einem Zustand geringer innerer Energie stabilisieren und durch das Rekonstitutionsmedium nur unvollständig oder langsam verdrängt werden, erklärt auch das ungewöhnliche Verhalten des Analyten bei pH 6,0. Gleichzeitig muß man berücksichtigen, daß die Proteinstruktur in der Nähe des IP empfindlich auf Veränderungen des pH-Wertes reagiert, weshalb das ungewöhnliche Verhalten nur unter diesen Bedingungen auftritt. Untersuchungen von Zhang et al. an Ribonuclease A und lyophilisiertem, rekombinantem Interleukin-2 zum Einfluß des Rekonstitutionsmediums zeigen, daß auch das Lösungsverhalten und der Proteinanteil mit nativer Struktur durch die Hintergrundelektrolyte beeinflusst werden [149].

Die Untersuchungen von Ovalbumin zeigen, daß unter bestimmten, analytisch kritischen Bedingungen Zusätze aus dem Gefriertrocknungsprozeß die Ergebnisse nachhaltig beeinflussen können. Diese Beobachtung macht deutlich, daß die Stabilität der Tertiär-/Quartärstruktur wichtig ist bei der Adsorption von Proteinen an der Kapillaroberfläche und damit auch für die Reproduzierbarkeit von Meßergebnissen. Daraus ergeben sich neue Ansätze, die unabhängig von elektrostatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen zu sehen sind und möglicherweise Verbesserungen bei der kapillarzonenerektrophoretischen Analytik von Proteinen bringen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist ein weit verbreitetes Phänomen, das nicht auf den Bereich der pharmazeutischen Analytik beschränkt ist. Vielmehr handelt es sich um ein Verhalten von Proteinen, das im Bereich der biotechnologischen Verfahrenstechnik oder der Implantationsmedizin [7] kritisch eingestuft wird, während die Adsorption bei der Entwicklung von Biosensoren [8] oder Testsystemen [150] bewußt eingesetzt wird, um Enzyme auf Trägersystemen zu immobilisieren.

Die Bildung von Proteinadsorbaten führt in der Kapillarelektrophorese zu Schwierigkeiten, da einerseits die Wiederfindungsrate der Substanz vermindert wird, andererseits die Leistungsfähigkeit des analytischen Systems beeinträchtigt werden kann. In der Literatur sind nur wenige Informationen zu finden, welche Faktoren neben dem isoelektrischen Punkt des Proteins zu dem jeweiligen Verhalten beitragen.

Die in Kapitel 4 beschriebenen Experimente zur kapillarisoelektrischen Fokussierung sind mit der Zielsetzung durchgeführt worden, die Reproduzierbarkeit der Methode zu verbessern. Dem Mobilisierungsschritt kommt hierbei besondere Bedeutung zu. Unter den verschiedenen Möglichkeiten, die bestehen, um die fokussierten Probenzonen zum Detektor zu transportieren, reagiert die Variante am empfindlichsten auf Störungen, die auf der Mobilisierung durch den EOF basiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Reproduzierbarkeit durch die Bildung von Proteinadsorbaten beeinträchtigt wird. Um Verbesserungen erreichen zu können, ist es notwendig, die Proteinmenge zu reduzieren. Einbußen bei der Empfindlichkeit lassen sich kompensieren, indem die Detektionswellenlänge von 280 nm in den kürzerwelligen UV-Bereich verschoben wird. Die Schwierigkeiten bei der Quantifizierung, welche durch die Absorption von Trägerampholyten verursacht werden, sind erst unterhalb von 220 nm deutlich ausgeprägt. Daher bietet sich Bereich von 230-250 nm an, da der Absorptionskoeffizient der Proteine größer ist als bei 280 nm und gleichzeitig die Basislinienschwankungen noch nicht deutlich ausgeprägt sind. Gleichzeitig zeigen die Resultate auch, daß die Bildung von Proteinadsorbaten nicht auf native Kieselglaskapillaren beschränkt ist, sondern auch bei Polyacrylamid-Beschichtungen Kapillaren auftritt und die Reproduzierbarkeit erheblich beeinträchtigt. Die Ergebnisse stehen scheinbar in Widerspruch zu den Angaben zur Reproduzierbarkeit mit RSD%-Werten im Bereich <2% für  $t_{\text{Mig}}$ .

welche in den Arbeiten Landsun et al. [13], Patrick und Lagu [24] oder Wehr et al. [88] veröffentlicht worden sind. Man muß jedoch berücksichtigen, daß den wenigen Angaben Meßreihen zu Grunde liegen, die sechs oder weniger Läufe umfassen und meist aus der Qualitätskontrolle von proteinogenen Arzneimitteln stammen. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen (vgl. Kapitel 4.1.2 und [87]), daß vergleichbare Werte für kurze Meßreihen mit bis zu 10 Läufen möglich sind, die RSD%-Werte für längere Meßreihen ( $n=106$ ) jedoch 7,21 und 13,23% liegen.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens bestand darin zu klären, welche Protein-spezifischen Größen, wie z. B. das Molekulargewicht, die Tertiär-/Quartärstruktur und die Hydrophilie/GRAVY-Scores, relevant sind. Es kann gleichzeitig geprüft werden, unter welchen Bedingungen die Verwendung von beschichteten Kapillaren vorteilhaft ist.

Um die ausgewählten Modellproteine systematisch auf ihr Adsorptionsverhalten hin untersuchen zu können, wurde eine Methode entwickelt (s. Kap. 5.2.1), die auf der Abhängigkeit des  $\zeta$ -Potentials von der Ladungsdichte auf der Kapillaroberfläche abhängt (vgl. Kap. 1.4). Durch den Vergleich der elektrophoretischen Mobilität in einem System vor, während und nach der Proteinuntersuchung lassen sich Veränderungen der Kapillaroberfläche leicht erfassen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei pH-Werten in der Nähe vom isoelektrischen Punkt des untersuchten Proteins deutliche Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit von Meßergebnissen auftreten. Sie werden hauptsächlich durch Coulombsche Kräfte zwischen Protein und Kieselglasoberfläche vermittelt, allerdings zeigen die Ergebnisse von  $\beta$ -Lactoglobulin, daß in Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren ebenfalls Adsorptionseffekte auftreten können. Diese werden wahrscheinlich durch van-der-Waals-Kräfte vermittelt.

Die Untersuchungen an boviner Catalase machen deutlich (Kap. 5.4), daß sich die Zusammensetzung des verwendeten Hintergrundelektrolyten nicht nur auf die Reproduzierbarkeit auswirkt, sondern auch die Quartärstruktur des Proteins beeinflusst. Die molekulare Masse hat insgesamt nur einen geringen Einfluß auf die Analytik. Sowohl bei Cytochrom C ( $M_r=12,8$  kDa) als auch bei boviner Catalase ( $M_r\sim 245$  kDa) lassen sich reproduzierbare Ergebnisse erst bei pH-Werten erzielen, die ca. eine 1-1,5 Einheiten über dem jeweiligen IP liegen.

Durch die Untersuchung von  $\beta$ -Lactoglobulin konnte gezeigt werden (Kap. 5.5 und 5.6), daß neben den Wechselwirkungen zwischen Protein und Kapillaroberfläche auch die Stabilität der Tertiär- und Quartärstruktur entscheidenden Einfluß auf die Reproduzierbarkeit hat. Die sich plötzlich verändernden elektrophoretischen Eigenschaften im Bereich zwischen pH 6,0 und 7,0 treten sowohl in beschichteten als auch in unbeschichteten Kapillaren auf. Im Gegensatz zu den strukturellen Veränderungen des Proteins in alkalischer Lösung wirken sich diese Prozesse in der Nähe des IP deutlicher aus. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen, daß durch Sterilfiltration der Proteinlösung sich die Schwierigkeiten positiv beeinflussen lassen, die durch die Bildung von Assoziaten und Clustern im pH-Bereich um den IP mit verursacht werden. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf Myoglobin übertragen. Die Versuchsreihen, die mit diesem Protein durchgeführt wurden, bestätigen die Ergebnisse bei  $\beta$ -Lactoglobulin. Die Untersuchungen zeigen darüber hinaus, daß bei pH-Werten am und wenig unterhalb des IP zusätzlich chromatographische Prozesse ablaufen, da sich die elektrophoretische Mobilität in Bezug auf den internen Standard meßbar zunimmt. Gleichzeitig zeigen die Untersuchungen bei pH 6,4, daß unter den in der CE üblichen Versuchsbedingungen kein Zustand erreicht wird, bei der ein Gleichgewicht zwischen Ad- und Desorption erreicht wird.

Die Versuchsreihen mit SDS-haltigen Lösungen (Kap. 5.7.2) zeigen einen weiteren wichtigen Faktor, der bei der Analytik von Proteinen in der CZE berücksichtigt werden muß. Während sich adsorbiertes Myoglobin sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 9,2 mit Tensid-haltigen Lösungen im Anschluß an die Untersuchungen auswaschen läßt, ist dies nicht mehr möglich, wenn seit Beginn der Versuche mehr als 24 Stunden vergangen sind.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch bei Ovalbumin konstatieren. Die Untersuchungen bei pH 6,0 demonstrieren einerseits den Einfluß von Lyophilisationszusätzen auf die Stabilität des Verfahrens, andererseits beobachtet man plötzlich auftretende Veränderungen der elektroosmotischen Mobilität, die durch die Alterungsprozesse des adsorbierten Proteins bedingt werden.

Mit den gewonnenen Erkenntnissen lassen sich anschließend Analysenmethoden entwickeln, welche die notwendige Robustheit und Präzision besitzen, um in der Routineanalytik von proteinogenen Arzneistoffen eingesetzt werden zu können. Die statis-

tische Auswertung der Versuchsreihen zeigt, daß sich anhand der Schwankungen von Meßgrößen, wie den Migrationszeiten von EOF-Marker und internem Standard eine Reihe von Informationen gewinnen lassen. Darüber hinaus läßt sich der Einfluß von Temperaturschwankungen auf die effektive Mobilität des Proteins durch Korrelation mit den  $\mu_{\text{eff}}$ -Werten des internen Standards mathematisch korrigieren. Dies erlaubt äußere Faktoren zu eliminieren, welche bei der Beurteilung der Vergleichspräzision stören (vgl. Kap. 5.8.1.2 und 5.8.2). Dieser Ansatz geht damit über die übliche Verwendung von internen Standards hinaus, wie sie üblich ist, um beispielsweise den Einfluß von Injektionsfehlern auf die Peakflächen zu eliminieren [151].

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß unterschiedliche Faktoren wie Ionenstärke der Hintergrundelektrolytlösung, pH-Wert des Puffers, IP des zu untersuchenden Proteins und dessen strukturelle Stabilität entscheidende Faktoren für die Präzision einer kapillarelektrophoretischen Methode sind. Neben dem üblichen Ansatz, die Proteinuntersuchungen oberhalb des isoelektrischen Punktes durchzuführen, läßt sich die Proteinadsorption auch durch andere Maßnahmen beeinflussen. Dazu gehört auch die Verwendung von Zusätzen, welche die Stabilität der Tertiär- und Quartärstruktur des Analyten erhöhen. Neben Salzen mit taxigenen Eigenschaften, wie sie in der Hofmeister-Serie eingestuft werden, können sich auch Kryoprotektan-ten positiv auf die Reproduzierbarkeit auswirken.

In Bezug auf die Kapillarbeschichtungen ist es wichtig, den Prozeß der Oberflächen-derivatisierung besser steuern zu können, um zu gleichmäßigen und reproduzierbaren Derivatisierungen zu gelangen. Forschungsergebnisse aus der Implantationsmedizin oder der Keramikentwicklung zeigen aber auch, daß Werkstoffe mit neuartigen Oberflächeneigenschaften die Proteinadsorption besser beherrschbar machen und für den Einsatz in der Kapillarelektrophorese von Vorteil sein können. Andererseits kann ein besseres Verständnis der Adsorptionsprozesse nicht nur in der CE zur Verbesserung der Analytik beitragen, sondern auch in anderen Bereichen zu positiven Entwicklungen beitragen, die in Zusammenhang mit der Proteinadsorption stehen.



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Instrumentierung

#### 7.1.1 Geräte

Die praktischen Arbeiten wurden auf verschiedenen CE-Geräten durchgeführt. Die Versuche zur CIEF wurden mit der P/ACE MDQ Kapillarelektrophorese von Beckman (Beckman, Fullerton, CA, USA) durchgeführt, während die CZE-Experimente zur Proteinadsorption auf zwei Crystal CE 310 Systemen von Unicam (UniCAM Ltd. Cambridge, UK) gemacht wurden (vgl. Tab. 7.1.1).

Hersteller	Modell	Detektor	OS
Beckman	P/ACE MDQ CE	UV-/PDA-Modul	Windows 2000 Pro
Unicam	Crystal CE 310 System	SpectraPhysics Spectra 100 UV	Windows 3.1

Tabelle 7.1.1.1: Überblick Geräte

#### 7.1.2 Software

Für die Steuerung der Geräte und zur statistischen Auswertung notwendige Softwarepakete sind in den Tabellen 7.1.2 und 7.1.3 zusammengefaßt.

Gerät	Aufgabe	Bezeichnung	Version
Beckman	Gerätesteuerung	32 CARAT Gold	5.00 (2003)
	Datenaufnahme	32 CARAT Gold	5.00 (2003)
Unicam	Gerätesteuerung	UICS CE	1.3B (1995)
	Datenaufnahme	4880 Data Handling System	1.2 (1995)
	Auswertung	K.I.S.S.	1.00 (1996)

Tabelle 7.1.2.1: Software der CE-Geräte

Statistische Auswertung	Windows 2000 Pro	SP4
	Microsoft Excel	2002 inkl. SP1+2

Tabelle 7.1.2.2: Software

### 7.2 Kapillaren

Es wurden bei den experimentellen Arbeiten Kapillaren von Polymicro (Polymicro Technologies LLC, Phoenix, AZ, USA) und Bio-Rad Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verwendet. Die verwendeten Chargen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet unter Angabe des Typs, des inneren sowie äußeren Durchmessers. Mit (linnearm) Polyacrylamid-beschichtete Kapillartypen (BioCAP™) sind hauptsächlich für die isoelektrische Fokussierung verwendet worden, kamen aber auch zum Einsatz bei

den Vergleichen zum Adsorptionsverhalten von  $\beta$ -Lactoglobulin an unterschiedlichen Kapillaroberflächen. Die Vorbereitung der Kapillaren erfolgte durch 30minütiges Spülen mit der jeweils verwendeten Pufferlösung.

Die Konditionierung und Äquilibration der unbeschichteten Kapillaren erfolgt nach einem einheitlichen Procedere. Die Aktivierung der Oberfläche erfolgt durch 120 minütiges Ätzen mit Natronlauge ( $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 1200 mbar). Anschließend wird die Lauge durch 30minütiges Spülen mit dem zu verwendendem Trennpuffer aus dem System entfernt. Nach dem notwendigen Austausch des Auslaßgefäßes wird zur Äquilibration der Kapillaroberfläche für 120-180 min Spannung angelegt.

Die Kapillarlänge und die effektive Kapillarlänge sind bei den Zusammenfassungen der einzelnen Meßserien angegeben. Alle Meßserien sind bei 24° C bzw. Raumtemperatur durchgeführt worden; da die Crystal CE 310 Systeme über effektiven Kühlvorrichtungen verfügen, weicht die Temperatur teilweise nach oben ab.

Hersteller	Charge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	Typ
Bio-Rad	75471	50	375	BioCAP™ (lineares Polyacrylamid)
Polymicro	LVF 03M	50	260	Polyacrylamid
Polymicro	AUL 02A	27	367	bare fused silica
Polymicro	GBH 02C	46-50	353	bare fused silica
Polymicro	RWI 01A	46-50	363-369	bare fused silica
Polymicro	XFZ 05A	50	360	bare fused silica
Polymicro	DRR 05A	51	360	bare fused silica
Polymicro	DUI 02A	79	360	bare fused silica

Tabelle 7.2.1: Kapillarchargen

### 7.3 Reagenzien und Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien entsprechen entweder dem ACS Standard p.a. oder weisen Arzneibuchqualität auf. Ausgenommen sind hiervon Pharmalyte™ 3-10 und Melamin (2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin), welche nicht in dieser Qualitätsstufe erhältlich sind. Die untersuchten Proteine sind von Sigma bezogen worden und wurden ohne weitere Reinigungsschritte, sofern nicht anders beschrieben, verwendet.

Reagenz	Hersteller	Art.-Nr.	Qualität
Borsäure	Merck	1.00165.0500	p.a. (>99,8%)
Essigsäure	Flucka	45740	purum (>99,0%)
Essigsäureanhydrid	Flucka	45840	purum (>98,0%)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	Flucka	79621	p.a. ACS 85%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën	31270	Ph. Eur. (>99,5%)
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	Flucka	RB11464	p.a. (>99,5%)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Flucka	30427	p.a. (>99,0%)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haën	30435	Ph. Eur. (>99,5%)
NaCl	Flucka	71378	ACS (>99,5%)
Natriumacetat	Flucka	RA14203	p.a. (>99,0%)
Natriumhydroxid	Flucka	71692	purum (>97,0%)
Natriumdodecanoat (SDS)	Flucka	61715	purum (>98,0%)
Pharmalyte™ 3-10	Pharmacia	14-0456-01	
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Sigma	H-3785	USP XXIII
Acetanilid	Flucka	400	purum (~99%)
N-Butylscopolaminiumbromid	Sigma	S7882	ACS (>99%)
Neostigminbromid	Sigma	N-2001	ACS (>98%)
Nikotinsäure	Merck	500005	USP XV
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	Flucka	63600	purum (>99,0%)

Tabelle 7.3.1: Reagenzien

Protein	Lieferant	Gewebe	Art.-Bz.	Charge	M <sub>theo</sub> [kDa]
Catalase	Sigma	Leber (Bos taurus)	C-9322	Lot 042K7049	57,59
Cytochrom C	Sigma	Myocard (Equus caballus)	C-2506	Lot 043K7032	16,95
β-Lactoglobulin	Sigma	Milch (Bos taurus)	L-2506	Lot 095H7000	18,28
Myoglobin	Sigma	Myocard (Equus caballus)	M-1882	Lot 129H7000	12,38
Myoglobin	Sigma	Myocard (Equus caballus)	M-1882	Lot 090K7041	12,38
Ovalbumin	Sigma	Ei (Gallus gallus)	A-5303	Lot 81K7025	42,75

Tabelle 7.3.2: Proteine

## 7.4 Lösungen und Puffer

Für die Herstellung aller Lösungen wird bidestilliertes Wasser verwendet. Die in den CZE Versuchen eingesetzten Puffersysteme decken einen pH-Bereich von 5,00 bis 11,50 ab (s. Tabelle 7.5.1-3). Als interne Standards sind wahlweise Neostigminbromid, N-Butylscopolaminiumbromid und 2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin verwendet worden und als EOF-Marker diente Acetanilid. Die Substanzen werden direkt im verwendeten Puffer gelöst. Alle Lösungen werden vor Gebrauch durch Rotilabo®-Filter (CME, 220 µm; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gegeben und im Ultraschallbad ent-

gast. Die Proteinlösungen werden in der Weise hergestellt, indem die Analyten in isotonischer Kochsalzlösung solvatisiert und durch Filtration von größeren Partikeln befreit werden. Die genauen Einwaagen sind im Anhang genauso aufgelistet wie die resultierenden Konzentrationen und die pro Lauf injizierte Menge der Analyten.

Acetat-Puffer	V <sub>soll</sub> [μl]	V <sub>soll</sub> [μl]	m <sub>soll</sub> [mg]	V <sub>soll</sub> [ml]	n <sub>soll</sub> [mmol]	n <sub>soll</sub> [mmol]
V = 100,0 ml	HOAc	(Ac) <sub>2</sub> O	NaAcO	NaOH 1 M	HOAc	AcO <sup>-</sup>
pH 5,00 50 mmol·l <sup>-1</sup>	98,14	0,00	0,00	3,200	1,800	3,200
pH 5,00 100 mmol·l <sup>-1</sup>	196,27	0,00	0,00	0,000	3,600	6,400
pH 5,25 100 mmol·l <sup>-1</sup>	0,00	114,40	623,30	0,000	2,403	7,597
pH 5,50 50 mmol·l <sup>-1</sup>	41,17	0,00	348,27	0,000	0,755	4,245

Tabelle 7.4.1: Essigsäure/Acetat-Puffer

Phosphat-Puffer	m <sub>soll</sub> [mg]	m <sub>soll</sub> [mg]	n <sub>soll</sub> [mmol]	n <sub>soll</sub> [mmol]
V = 100,0 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
pH 6,00 50 mmol·l <sup>-1</sup>	640,93	51,69	4,710	0,290
pH 6,50 50 mmol·l <sup>-1</sup>	569,42	145,21	4,184	0,816
pH 7,00 50 mmol·l <sup>-1</sup>	420,92	339,44	3,093	1,907
pH 8,00 50 mmol·l <sup>-1</sup>	94,96	765,76	0,698	4,302
pH 9,20 50 mmol·l <sup>-1</sup>	6,89	880,94	0,051	4,949
V = 100,0 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	NaOH 1 mol·l <sup>-1</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
pH 11,00 50 mmol·l <sup>-1</sup>	889,95	223 μl	4,777	0,223
pH 11,50 50 mmol·l <sup>-1</sup>	889,95	644 μl	4,356	0,644

Tabelle 7.4.2: Phosphat-Puffer

Tabelle 8: Phosphat-Puffer

Borat-Puffer	m <sub>soll</sub> [mg]	m <sub>soll</sub> [mg]	n <sub>soll</sub> [mmol]	n <sub>soll</sub> [mmol]
V = 100,0 ml	B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
pH 8,40 120 mmol·l <sup>-1</sup>	495,13	380,62	10,000	2,000
pH 9,20 100 mmol·l <sup>-1</sup>	0,00	953,45	5,000	5,000
pH 10,50 100 mmol·l <sup>-1</sup>	181,73 NaOH	953,45	0,477	9,523

Tabelle 7.4.3: Borsäure/Borat-Puffer

Bei der Herstellung des Essigsäure/Natriumacetat-Puffers pH 5,00 (100 mmol·l<sup>-1</sup>) für die Meßserien MYOA-240602, MYOA-250602, MYOA-280602 und MYOA-120702 wird von der obigen Herstellungsvorschrift abgewichen, indem 10,0 ml Essigsäure (Titrisol 1.09951, 1 mol·l<sup>-1</sup>, f=1,000, Merck KGaA, Darmstadt) und 32,0 ml Natronlauge (Titrisol 1.09959, 0,2 mol·l<sup>-1</sup>, f=1,000, Merck KGaA, Darmstadt) mit bidestilliertem Wasser auf 500,0 ml aufgefüllt werden. Weiterhin ist bei den Versuchsserien MYOA-130502, MYOA-160502 und MYOA-240502 Phosphat-Puffer pH 7,00 höherer Konzentrationen

eingesetzt worden, welcher unter Verwendung von Stammlösungen (Titrisol 1.09887, 134 mmol·l<sup>-1</sup>, Merck KGaA, Darmstadt) hergestellt wurde.

## **7.5 Dialyse**

Bei den Untersuchungen zum Einfluß von Lyophilisationszusätzen wurden Dialyserschläuche Spectra/Por® CE Float A Lyzer® system (MWCO 5000, Celluloseether, pt.-no. 235066; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA 90220 USA) benutzt. Zunächst wird die Natriumazid-haltige Konservierungslösung entfernt, anschließend werden die Dialysesysteme 60 min vor Gebrauch mit bidestilliertem Wasser nachgespült und dann in die isotonische Kochsalzlösung eingebracht. 10 ml der zu reinigenden Proteinlösung werden unter ständigem Rühren für 24 h bei 4° C gegen 100 ml Kochsalzlösung dialysiert.

## **7.6 Kapillarisoelektrische Fokussierung**

Die CIEF-Versuche sind mit einem Beckman P/ACE MDQ CE-Gerät durchgeführt worden. Bedingt durch die Bauart des Kapillarkassetten-Systems läßt sich die Gesamtlänge auf 34 cm reduzieren, die effektive Trennstrecke beläuft sich auf 23 cm. Die angewendete Methode basiert auf einer gleichzeitigen Fokussierung und Mobilisierung der Analyten.

### **7.6.1 Herstellung von Ampholyt-, Blind- und Probenlösungen**

Sowohl für die Blind- als auch die Probenlösung wird eine Ampholyt-Lösung benötigt. Für deren Herstellung muß zunächst eine 4%ige Hydroxypropylmethylcellulose-Lösung hergestellt werden. Dazu werden 2,00 g HPMC in 50,0 ml Wasser gelöst und 24 Stunden bei 8° C gerührt. Anschließend werden 10,0 ml dieser Lösung mit 1,00 ml Pharmalyte™ 3-10 gemischt und auf 25,0 ml aufgefüllt mit Wasser. Die Blindlösung wird durch Mischen gleicher Volumina Wasser und Ampholytlösung hergestellt. Für die Probenlösungen werden 2,5 ml der Ampholytlösung mit der Proteinlösung gemischt und ebenfalls mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5,0 ml aufgefüllt. Die jeweiligen Einwaagen an Myoglobin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Ovalbumin sind in Tab. 7.6.1 zusammengefaßt.

<b>V = 10,0 ml</b>	<b>Myoglobin</b>	<b>β-Lactoglobulin</b>	<b>Ovalbumin</b>
02.03.04	12,46 mg	23,12 mg	47,16 mg
02.03.05	30,81 mg	56,18 mg	111,40 mg
02.03.11	30,81 mg	56,18 mg	111,40 mg
02.03.19	7,13 mg	14,14 mg	25,14 mg

Tabelle 7.6.1.1: Einwaagen Proteine CIEF

### 7.6.2 Arbeitsvorschrift für CIEF-Experimente

Für die Fokussierung wird als Analytenlösung 10 mM Phosphorsäure verwendet, als Katholyt kommt 20 mM Natronlauge zum Einsatz. Diese werden durch Verdünnen bzw. Lösen von 577 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% (m/V) bzw. 400,0 mg NaOH zu 500,0 ml hergestellt. Initial wird die Kapillare einige Minuten mit Blindlösung gespült. Anschließend wird das gesamte Volumen gegen die Untersuchungslösung ausgetauscht. Die Trennung der Analyten erfolgt bei 7,5 bzw. 8,0 kV, wobei anodisch 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und kathodisch 20 mM Natronlauge vorgelegt werden. Abschließend wird die Kapillare mit Wasser und Blindlösung, respektive nur mit Blindlösung, gespült. Die jeweiligen Versuchsparameter sind den Tabellen 7.6.2 und 7.6.3 aufgelistet.

<b>Serie</b>	<b>Spülen 1</b>	<b>Injektion</b>	<b>Fokussierung</b>	<b>Spülen 2</b>	<b>Spülen 3</b>
03.02.04	3 min	99 s	20 min	-	2 min
03.02.05	4 min	99 s	20 min	-	3 min
03.02.11	4 min	99 s	30 min	5 min	5 min
03.02.19	4 min	99 s	30 min	5 min	10 min

Tabelle 7.6.2.1: Zeiten CIEF

<b>Serie</b>	<b>Spülen 1</b>	<b>Injektion</b>	<b>Fokussierung</b>	<b>Spülen 2</b>	<b>Spülen 3</b>
03.02.04	1034,55 mbar	1724,25 mbar	0 mbar/7,5 kV	-	1034,55 mbar
03.02.05	1034,55 mbar	1034,55 mbar	0 mbar/7,5 kV	-	1034,55 mbar
03.02.11	1034,55 mbar	1034,55 mbar	0 mbar/8,0 kV	689,7 mbar	1034,55 mbar
03.02.19	1034,55 mbar	1034,55 mbar	0 mbar/8,0 kV	689,7 mbar	1034,55 mbar

Tabelle 7.6.2.2: aufgewendete Drücke CIEF

Bedingt durch das Prinzip der Probenaufgabe läßt sich die zu fokussierende Proteinmenge am besten dadurch reproduzieren, daß die Kapillare vollständig mit der Probenlösung gefüllt wird. Um unterschiedliche Substanzmengen untersuchen zu können, werden unterschiedlich konzentrierte Lösungen verwendet. Innerhalb der Meßreihen sind Proben unterschiedlichen Gehaltes verwendet worden. Die pro Fokussierung eingesetzten Substanzmengen sind in Tabelle 7.6.4 zusammengefaßt.

<b>V<sub>Kapillare</sub> = 648 nl</b>	<b>Myoglobin</b>	<b>β-Lactoglobulin</b>	<b>Ovalbumin</b>
Chemische Mobilisierung			
04/02/03 Level 1	20,19 ng	37,45 ng	76,40 ng
04/02/03 Level 2	100,93 ng	187,27 ng	382,00 ng
04/02/03 Level 3	201,85 ng	374,54 ng	763,99 ng
04/02/03 Level 4	403,70 ng	749,09 ng	1527,98 ng
Endoosmotische Mobilisierung			
05/02/03 Level 2	11,551 ng	22,907 ng	40,727 ng
05/02/03 Level 3	0,599 µg	1,092 µg	2,166 µg
05/02/03 Level 4	0,799 µg	1,456 µg	2,887 µg
05/02/03 Level 5	0,998 µg	1,820 µg	3,609 µg
Endoosmotische Mobilisierung			
11/02/03 Level 2	0,599 µg	1,092 µg	2,166 µg
Endoosmotische Mobilisierung			
19/02/03 Level 2	0,998 µg	1,820 µg	3,609 µg

Tabelle 7.6.2.3: injizierte Proteinmengen





## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Landers, J. P. (Hrsg.)  
Handbook of capillary electrophoresis  
CRC Press, Boca Raton, FL (USA), 2. Aufl. **1997**, 101-138.
- [2] Reuter, U.  
Elektrophorese und Kapillarelektrophorese  
Universität Ulm, Fakultät für Naturwissenschaften, Analytische Chemie und Umweltchemie, **2004**.
- [3] Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, S.  
Capillary Electrophoresis: Principles and Practice  
Springer-Verlag, Berlin, 1. Aufl. **1993**.
- [4] Towns, J. K., Regnier, F. E.  
Impact on Polycation Adsorption on Efficiency and Electroosmotically Driven Transport in Capillary Electrophoresis  
Anal. Chem. 64 **21** (1992), 2473-2478.
- [5] Corradini, D., Cannarssa, G.  
Capillary Electrophoresis Analysis of Proteins in Bare Fused-Silica Capillaries  
LC-GC 14 **12** (1996), 326-330.
- [6] Rehder, M. A., McGown, M. A.  
Open-tubular capillary electrochromatography of bovine  $\beta$ -lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase  
Electrophoresis 22 **17** (2001), 3759-3764.
- [7] Uhlemann, J., Lender, M., Freyer, R.  
Zeta-Potential und Chemolumineszenz zur Bestimmung der Biokompatibilität von Glas und Silizium  
Technische Universität Dresden, Fakultät Elektrotechnik und Informationstechnik <http://www.bio-avt.de/beitraege.php> (**2004**).
- [8] Deere, J., Magner, E., Wall, J. G., Hodnett, B. K.  
Adsorption and activity of cytochrome c on mesoporous silicates  
Chem. Comm. (2001), 465-466.
- [9] Steinmann, L., Mosher, R. A., Thormann, W.  
Characterization and impact of the temporal behaviour of the Electroosmotic flow in capillary isoelectric focusing with electroosmotic zone displacement  
J. Chromatogr. A 756 **1-2** (1996), 219-323.
- [10] Vogel, W.  
Glas Chemie  
Springer-Verlag, Berlin, 3. Aufl., **1992**, ISBN 3-540-55171-9.
- [11] Wanders, B. J.  
Data Analysis in Capillary Electrophoresis  
Landers, J. P. (Ed.), Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, Boca Raton, FL **1997**, 449-456.
- [12] Schirm, B., Wätzig, H.  
Peak recognition imitating the human judgement  
Chromatographia 48 **5-6** (1998), 331-346.

- [13] Lasdun, A. M., Kurumbail, R. R., Leimgruber, N. K., Rathore, A. S.  
Validatibility of a capillary isoelectric focusing method for impurity quantitation  
J. Chromatogr. A 917 **1-2** (2001), 147-158.
- [14] Hjertén, S., Liao, J.-L., Yao, K.  
High-performance electrophoresis Elimination of electroendosmosis and solute adsorption  
J. Chromatogr. 347 (1985), 191-198.
- [15] Mazzeo, J. R., Krull, I. S.  
Capillary Isoelectric Focusing of Proteins in Uncoated Fused-Silica Capillaries Using Polymeric Additives  
Anal. Chem. 63 **24** (1991), 2852-2857.
- [16] Bello, M. S., Capelli, L., Righetti, P. G.  
Dependence of the electroosmotic mobility on the applied electric field and its reproducibility in capillary electrophoresis  
J. Chromatogr. A 684 **2** (1994), 311-322.
- [17] Strelec, I., Pacakova, V., Bosakova, Z., Coufal, P., Guryca, V., Stulik, K.  
Modification of capillary electrophoresis capillaries by poly(hydroxyethyl methacrylate), poly(diethylene glycol monomethacrylate) and poly(triethylene glycol monomethacrylate)  
Electrophoresis 23 **4** (2002), 528-535.
- [18] Schmeer, G.  
Quantenmechanische und Molekulardynamische Modellierung Chemischer Reaktionen  
Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, **2004**.
- [19] Kohr, J., Engelhardt, H.  
Characterization of quartz capillaries for capillary electrophoresis  
J. Chromatogr. A 652 (1993), 309-316.
- [20] Ghosal, S.  
Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis  
Electrophoresis 25 **2** (2004), 214-228.
- [21] Schomburg, G.  
Coated capillaries in high-performance capillary electrophoresis  
High-performance capillary electrophoresis: theory, techniques, and applications: Khaledi, Morteza G. (Hrsg.), John Wiley and Sons Ltd., **1998**, New York, NY [u.a.], 481-523. ISBN 0-471-14851-2.
- [22] Dickens, J. E., Gorse, J., Everhart, J. A., Ryan, M.  
Dependence of electroosmotic flow in capillary electrophoresis on Group I and II metal ions  
J. Chromatogr. B 657 **2** (1994), 401-407.
- [23] Schumacher, K., Winter, G., Mahler, H.C.  
Instabilitäten von Proteinarzneimitteln  
PZ Prisma 10 (2003), 15-18.
- [24] Patrick, J. S., Lagu, A. L.  
Review applications of capillary electrophoresis to the analysis of biotechnology-derived therapeutic proteins  
Electrophoresis 22 **19** (2001), 4179-4196.

- [25] Wätzig, H., Hille, J., Ohnesorge, J., Graf, M.  
Dem Proteom auf der Spur  
Pharm. Ztg. 147 **8** (2002), 560-565.
- [26] Kunkel, A., Wätzig, H.  
Pharmacokinetic investigation with direct injection of Plasma samples: possible advantages using capillary electrophoresis  
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 332 (1999), 175-178.
- [27] Kunkel, A., Wätzig, H.  
Micellar electrokinetic capillary chromatography as a powerful tool for pharmacological investigations without sample pretreatment: A precise technique providing cost advantages and limits of detection to the low nanomolar scale  
Electrophoresis 20 **12** (1999), 2379-2389.
- [28] Anthony, L. J., Holland, R. A.  
Glass surface chemistry via gaschromatography  
J. Non.-Cryst. Solids 120 (1990), 82-92.
- [29] Griffin, S.  
Fused-Silica Capillary - The Story behind the Column  
LC-GC 20 **10** (2002), 928-938.
- [30] Schuhmann, R. G.  
Quality of optical components and systems for laser applications  
Laser-Induced Damage in Optical Materials: 1998, Gregory J. Exarhos; Arthur H. Guenther; Mark R. Kozlowski; Keith L. Lewis; M. J. Soileau; (Eds.) Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 3578 (1999), 672-680.
- [31] Aita, C. R.  
Nanostructured ceramic coatings: engineering at atomic scale  
Surf. Eng. 15 **3** (1999), 195-204.
- [32] Allen, L. N.  
Progress in ion figuring large optics  
Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 2428 (1995), 237-247.
- [33] Itoh, N., Stoneham, A. M., Tanimura, K.  
Transient defects and electronic excitation, Devine, R.A.B. (Ed.), Duraud, J.-P. (Ed.), Doorryhée, E. (Ed.); Structure and Imperfections in Amorphous and Crystalline Silicon Dioxide Structure and imperfections in amorphous and crystalline silicon dioxide (2000), 329-347, John Wiley and Sons Ltd., New York, NY [u.a.] **2000**.
- [34] Reichling, M.  
Laser Ablation in Optical Components and Thin Films  
Experimental methods in the physical science Vol. 30, J. C. Miller, R. F. Haglund (Eds.), Academic Press, San Diego (USA) (**1998**), 573-624.
- [35] Wätzig, H., Kaupp, S., Graf, M.  
Inner surface properties of capillaries for electrophoresis  
Trends Anal. Chem. 22 **9** (2003), 588-604.
- [36] Heeg, J.  
XPS / XAES-Untersuchungen zur elektronischen und atomaren Struktur von amorphen Siliciumoxynitriden  
Dissertation, Universität Rostock 1994, 5-27.

- [37] Kaupp, S., Wätzig, H.  
Characterization of inner surface phenomena in capillary electrophoresis capillaries by electron microscopy, atomic force microscopy and secondary ion mass spectroscopy  
*Chromatogr. A* 781 **1-2** (1997), 55-65.
- [38] Pedraza, A. J.  
Excimer laser modification of material surfaces and interfaces  
*Int. Conf. Beam Process. Adv. Mater.* (**1993**), 69-80.
- [39] Griffin, S.  
Vertraulicher Schriftwechsel, **2002**
- [40] Dougherty, A. M., Cooke, N., Shieh, P.  
Capillary surface modification in capillary electrophoresis  
Landers, JP. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press,. Boca Raton, FL **1997**, 675–715.
- [41] Doherty, E. A. S., Berglund, K. D., Buchholz, B. A., Kourkine, I. V., Przybycien, T. M., Tilton, R. D., Barron, A. E.  
Critical factors for high-performance physically adsorbed (dynamic) polymeric wall coatings for capillary electrophoresis of DNA  
*Electrophoresis* 23 **16** (2002), 2766-2776.
- [42] Castelletti, L., Verzola, B., Gelfi, C., Stoyanov, A., Righetti, P. G.  
Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare fused silica wall in capillary electrophoresis III: Effects of adsorbed surfactants on quenching the interaction  
*J. Chromatogr. A* 894 **1-2** (2000), 281-289.
- [43] Altria, K. D.  
Enhanced pharmaceutical analysis by CE using dynamic surface coating system  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 **3** (2003), 447-453
- [44] Aguilar, C., Hofte, A. J. P., Tjaden, U. R., van der Greef, J.  
Analysis of histones by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionisation mass spectrometry  
*J. Chromatogr. A* 926 **1** (2001) 57-67.
- [45] Vuorensoa, K.  
Capillary Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry in Catecholamine Studies  
Dissertation, Helsinki **2002**, ISBN 952-10-0732-X.
- [46] Cretich, M., Stastna, M., Chrambach, A., Chiari, M.  
Decreased protein peak asymmetry and width due to static capillary coating with hydrophilic derivatives of polydimethylacrylamide  
*Electrophoresis* 23 **14** (2002), 2274-2278.
- [47] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G.  
Quantitative studies on the adsorption of proteins to the bare fused silica wall in capillary electrophoresis II: Effects of adsorbed, neutral polymers on quenching the interaction  
*J. Chromatogr. A* 874 **2** (2000), 293-303.
- [48] Righetti, P. G., Verzola, B., Gelfi, C., Castelletti, L.  
The state of the art of dynamic coatings  
*Electrophoresis* 22 **4** (2001), 603-611.

- [49] Beckers, J. L., Bocek, P.  
Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant.  
*Electrophoresis* 23 **12** (2002), 1947-1952.
- [50] Huang, T.-L., Tsai, P., Wu, C.-T., Lee, C. S.  
Mechanistic studies of electroosmotic control at the capillary-solution interface  
*Anal. Chem.* 65 **20** (1993), 2887-2893.
- [51] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G.  
Protein adsorption to the bare fused silica wall in capillary electrophoresis quantitative studies on the chemical composition of the background electrolyte for minimizing the phenomenon  
*J. Chromatogr. A* 868 **1** (2000), 85-99.
- [52] Herr., A. E., Molho, J. I., Santiago, J. G., Mungal, M. G., Kenny, T. W., Garguilo, M. G.  
Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential  
*Anal. Chem.* 72 **5** (2000), 1053-1057.
- [53] Bruin, G. J. M., Huisden, R., Kraak, J. C., Poppe, H.  
Performance of carbohydrate-modified fused silica capillaries for the separation of proteins by zone electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* 480 (1989), 339-349.
- [54] Ren, X., Shen, Y., Lee, M.  
Poly(ethylene-propylene glycol)-modified fused silica columns for capillary electrophoresis using resin as intermediate coating  
*J. Chromatogr. A* 741 **1** (1996), 115-122.
- [55] Shih, M. L., Korte W. D.  
Analysis of Hemoglobin Derivatives by Capillary Isoelectric Focusing and Its Application in the Antidotal Research of Cyanide Poisoning  
*Anal. Biochem.* 238 **2** (1996), 137-144.
- [56] Morrow, B. A., McFarlan, A. J.  
Chemical reactions at silica Surfaces  
*J. Non.-Cryst. Solids* 120 **1-3** (1990), 61-71.
- [57] Chen, Y.  
Critical conditions for separating the microheterogenous components of glycoproteins by capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* 768 **1** (1997), 39-45.
- [58] Nakatani, M., Shibukawa, A., Kakagawa, T.  
Sodium Dodecyl Sulfate-Linear Polyacrylamide-Bonded Capillary Electrophoresis for the Molecular Weight Determination of Proteins  
*Anal. Sciences* 10 **1** (1994), 1-4.
- [59] Albarghouthi, M. N., Stein, T., Barron, A. E.  
Poly-N-hydroxyethylacrylamide as a novel, adsorbed coating for protein separation by capillary electrophoresis  
*Electrophoresis* 24 **7-8** (2003), 1166-1175.
- [60] Cretich, M., Chiari, M., Pirri, G., Crippa, A.  
Electroosmotic flow suppression in capillary electrophoresis: Chemisorption of trimethoxy silane-modified polydimethylacrylamide  
*Electrophoresis* 26 **10** (2005), 1913-1919.

- [61] Chiari, M., Cretich, M., Stastna, M., Radko, S., Chrambach, A.  
Rapid capillary coating by epox-poly-dimethylacrylamide: performance in capillary zone electrophoresis of protein and polystyrene carboxylate  
*Electrophoresis*, 22, **4** (2001), 656-659.
- [62] Meagher, R. J., Seong, J., Laibinis, P. E., Barron, A. E.  
A very thin coating for capillary zone electrophoresis of proteins based on a tri (ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilane  
*Electrophoresis* 25 **3** (2004), 405-414.
- [63] Pesek, J. J., Matyska, M. T., Sandoval, J. E., Williamsen, J. E.  
Synthesis, characterization and application of hydride-based surface materials for HPLC, HPCE and electrochromatography  
*J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19 **19** (1996), 2843-2865.
- [64] Simurov, O. V., Belyakova, L. A., Tertykh, V. A.  
Catalytic hydrosilylation reactions involving modified silica surfaces  
*Functional Materials* 1 **1** (1995), 51-57.
- [65] Montes, M. C., Amen, van, C., Pesek, J. J., Sandoval, J. E.  
Chromatographic elution of alkyl-bonded phases prepared through olefin hydrosilylation on hydrate-silica intermediate  
*J. Chromatogr. A* 688 **1-2** (1994), 31-45.
- [66] Sandoval, J. E., Pesek, J. J.  
Hydrolytically stable bonded chromatographic phases prepared through hydrosilylation of olefins on a hydride-modified silica intermediate  
*Anal. Chem.* 63 **22** (1991) 2634-2641.
- [67] Rodriguez-Diaz, R., Zhu, M., Wehr, T.  
Strategies to improve performance of capillary isoelectric focusing  
*J. Chromatogr. A* 772 (1997), 145-160.
- [68] Hunt, G., Moorhouse, K. G., Chen, A. B.  
Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2  
*J. Chromatogr. A* 744 **1-2** (1996), 295-301.
- [69] Janini, G., Saptharishi, N., Waselus, M., Soman, G.  
Element of a validation method for MU-B3 monoclonal antibody using an imaging capillary isoelectric focusing system  
*Electrophoresis* 23 **11** (2002), 1605-1611.
- [70] Chen, A. B., Rickel, C. A., Flanigan, A., Hunt, G., Moorhouse, K. G.  
Comparison of ampholytes used for slab gel and capillary isoelectric focusing of recombinant tissue-type plasminogen activator glycoforms  
*J. Chromatogr. A* 774 **1-2** (1996), 279-284.
- [71] Tabushi, M., Baba, Y.  
A novel injection method for high-speed proteome analysis by capillary electrophoresis  
*Electrophoresis* 23 **7-8** (2002), 1138-1145.
- [72] Manabe, T., Miyamoto, H., Iwasaki, A.  
Effects of catholytes on the mobilization of proteins after capillary isoelectric focusing  
*Electrophoresis* 18 **1** (1997), 92-97.

- 
- [73] Manabe, T., Miyamoto, H., Iwasaki, A.  
Separation of human plasma/serum proteins by capillary isoelectric focusing in the absence of denaturing agents  
*Electrophoresis* 18 **7** (1997), 1159-1165.
- [74] Yang, L., Lee, C. S., Hofstadler, S. A., Pasa-Tolic, L., Smith, R. D.  
Capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein characterization  
*Anal. Chem.* 70 **15** (1998), 3235-3241.
- [75] Smith, R. D., Pasa-Tolic, L., Lipton, M. S., Jensen, P. K., Anderson, G. A., Shen, Y., Conrads, T. P., Udseth, H. R., Harkewicz, R., Belov, M. E., Veenstra, T. D.  
Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry  
*Electrophoresis* 22 **9** (2001), 1652-1668.
- [76] Jin, Y., Luo, G., Oka, T., Manabe, T.  
Estimation of isoelectric points of human plasma proteins employing capillary isoelectric focusing and peptide isoelectric point markers  
*Electrophoresis* 23 **19** (2002), 3385-3391.
- [77] Tang, Q., Harrata, A. K., Lee, C. S.  
Capillary isoelectric focusing-electrospray mass spectrometry for protein analysis  
*Anal. Chem.* 67 **19** (1995), 3515-3519.
- [78] Tang, Q., Harrata, A. K., Lee, C. S.  
High Resolution Capillary Isoelectric Focusing-Electrospray Ionization Mass Spectrometry For Hemoglobin Variants Analysis  
*Anal. Chem.* 68 **15** (1996), 2482-2487.
- [79] Yang, L., Lee, C. S., Hofstadler, S. A., Smith, R. D.  
Characterization of microdialysis acidification for capillary isoelectric focusing-microelectrospray ionization mass spectrometry  
*Anal. Chem.* 70 **15** (1998), 4945-4950.
- [80] Wätzig, H., Dette, C., J.  
Quantitative capillary electrophoresis (CE): methodological and instrumental aspects  
*J. Chromatogr. A* 636 **1** (1993), 31-38.
- [81] Kunkel, A., Degenhardt, M., Schirm, B., Wätzig, H.  
Quantitative capillary electrophoresis - performance of instruments, aspects of methodology and validation: an update  
*J. Chromatogr. A* 768 (1997), 17-27.
- [82] Hjertén, S., Liao, J.-L., Yao, K.  
Theoretical and experimental study of high-performance electrophoretic mobilization of isoelectrically focused protein zones  
*J. Chromatogr. A* 387 (1987), 127-138.
- [83] Hjertén, S., Zhu, M.  
Theoretical and experimental study of high-performance electrophoretic mobilization  
*J. Chromatogr. A* 347 (1985), 265-270.
-

- [84] Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T., Zhu, M.  
Capillary isoelectric focusing  
Electrophoresis 18 **12-13** (1997), 2134-2144.
- [85] Zhu, M., Rodriguez, R., Wehr, T.  
Optimizing separation parameters in capillary isoelectric focusing  
J. Chromatogr. A 559 **1-2** (1991), 479-488.
- [86] Kilár, F., Hjertén, S.  
Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high-performance isoelectric focusing in capillaries  
Electrophoresis 10 **1** (1989), 23-29.
- [87] Graf, M., Wätzig, H.  
Capillary isoelectric focussing (CIEF) – Reproducibility and protein adsorption  
Electrophoresis 25 **17** (2004), 2959-2964.
- [88] Wehr, T., Rodriguez-Diaz, R., Zhu, M.  
Recent Advances in Capillary Isoelectric Focusing  
Chromatographia Supplement 53 (2001), 45-58.
- [89] Thormann, W., Huang, T., Pawliszyn, J., Mosher, R. A.  
High-resolution computer simulation of the dynamics of isoelectric focusing of proteins  
Electrophoresis 25 **2** (2004), 324-337.
- [90] Hashimoto, M., Tsukagoshi, K., Kondo, K.  
Design of a Pressure-Mobilization System for Capillary Isoelectric Focusing-Chemiluminescence Detection  
Anal. Sci. 15 **12** (1999), 1281-1284.
- [91] Schwer, C.  
Capillary isoelectric focusing: A routine method for protein analysis?  
Electrophoresis 16 **11** (1995), 2121-2126.
- [92] Kirby, B. J., Hasslebrink, Jr., E. F.  
Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers  
Electrophoresis 25 **2** (2004), 203-213.
- [93] Zhu, M., Rodriguez, R., Wehr, T., Siebert, C.  
Capillary electrophoresis of hemoglobins and globin chains  
J. Chromatogr. A 608 **1-2** (1992), 225-237.
- [94] Rodriguez, I., Li, S. F. Y.  
Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis  
Anal. Chim. Acta 383 **1-2** (1999), 1-26.
- [95] Catai, J. R., Somsen, G. W., de Jong, G. J.  
Efficient and reproducible analysis of peptides by capillary electrophoresis using noncovalently bilayer-coated capillaries  
Electrophoresis 25 **6** (2004), 817-824.
- [96] Smith, R. D. (ed.)  
Paper Symposium: Proteomics without Gels  
Electrophoresis 23 **18** (2002), 3095-3096.
- [97] Lauer, H. H., McManigill, D.  
Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing  
Anal. Chem. 58 **1** (1986), 166-170.



- 
- [98] Yang, Y., Boysen, R. I., Hearn, M. T. W.  
Impact of organic solvents on the resolution of synthetic peptides by capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* 1043 **1** (2004), 81-89.
- [99] Yang, Y., Boysen, R. I., Hearn, M. T. W.  
Analysis of synthetic peptides by capillary electrophoresis: Effect of organic solvent modifiers and variable electrical potentials on separation efficiencies  
*J. Chromatogr. A* 1043 **1** (2004), 91-97.
- [100] Righetti, P. G., Gelfi, C., Bossi, A., Olivieri, E., Castelletti, L., Verzola, B., Stoyanov, A. V.  
Capillary Electrophoresis of peptides and proteins in isoelectric buffers: An update  
*Electrophoresis* 21 **18** (2000), 4046-4053.
- [101] Kubo, K.  
Separation of components of human globulins by capillary electrophoresis using a linear polyacrylamide-coated capillary  
*J. Chromatogr. B* 697 **1-2** (1997), 217-222.
- [102] Chang, W. W. P., Hobson, C., Bomberger, D. C., Schneider, L. V.  
Rapid separation of protein isoforms by capillary zone electrophoresis with new dynamic coatings  
*Electrophoresis* 26 **11** (2005), 2179-2186.
- [103] Pontoglio, A., Viganò, A., Sebastiano, R., Citterio, A., Maragnoli, L., Righetti, P. G., Gelfi, C.  
Peptide and protein separation by capillary electrophoresis in the presence of mono- and diquaternarized diamines  
*Electrophoresis* 25 **7-8** (2004), 1065-1070.
- [104] Daidone, I., Amadei, A., Roccatano, D., Di Nola, A.  
Molecular Dynamics Simulation of Protein Folding by Essential Dynamics Sampling: Folding Landscape of Horse Heart Cytochrome c  
*Biophys. J.* 85 **5** (2003), 2865-2871.
- [105] Gorba, C., Geyer, T., Helms, V.  
Brownian dynamics simulations of simplified cytochrome c molecules in the presence of a charged surface  
*J. Chem. Phys.* 121 **1** (2004), 457-464.
- [106] Carrasquillo, K. G., Sanchez, C., Griebenow, K.  
Relationship between conformational stability and lyophilization-induced structural changes in chymotrypsin  
*Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 **Pt. 1** (2000), 41-53.
- [107] Kim, Y.-S., Jones, L. S., Dong, A., Kendrick, B. S., Chang, B. S., Manning, M. C., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.  
Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins  
*Prot. Sci.* 12 **6** (2003), 1252-1261.
- [108] Dalglish, D. L.  
Modern Characterization Techniques for Crude Oils and Their Emulsions. Emulsions and Emulsion Stability, 1st Edition, J. Sjöblom, Editor, Taylor and Francis: New York, 1996), ISBN 0824746961.
-

- [109] Ghosal, S.  
The effect of wall interactions in capillary-zone electrophoresis  
J. Fluid Mech. 451 (2003), 285-300.
- [110] Stedry, M., Jaros, M., Hruskaa, V., Gas, B.  
Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis:  
III. Linear theory of electromigration  
Electrophoresis 25 **18-19** (2004), 3071-3079.
- [111] Jaros, M., Hruskaa, V., Stedry, M., Zuskova, I., Gas, B.  
Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis:  
IV. Computer program PeakMaster  
Electrophoresis 25 **23-24** (2004), 3092-3097.
- [112] Kirby, B. J., Hasslebrink, Jr., E. F.  
Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques,  
and effects on separation  
Electrophoresis 25 **2** (2004), 187-202.
- [113] Conlisk, A. T.  
The Debye-Hückel approximation: Its use in describing electroosmotic flow in  
micro- and nanochannels  
Electrophoresis 26 **10** (2005), 1896-1912.
- [114] Ghosal, S.  
Effect of Analyte Adsorption on the Electroosmotic Flow in Microfluidic Chan-  
nels  
Anal. Chem. 74 **4** (2002), 771-775.
- [115] Kaupp, S., Wätzig, H.  
Fused silica capillaries for capillary electrophoresis and gas chromatography -  
inner surface corrosion, within-batch differences and influence of drawing pa-  
rameters studied by atomic force microscopy  
Electrophoresis 20 **12** (1999), 2566-2574.
- [116] Wätzig, H., Degenhardt, M., Kunkel, A.  
Strategies for method development and validation in CE - related to pharma-  
ceutical and biological applications  
Electrophoresis 19 **16-17** (1998), 2695-2752.
- [117] Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D.,  
Bairoch A.  
Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server  
John M. Walker (Ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press To-  
towa, NJ, USA (**2005**), 571-607, ISBN: 1-58829-343-2.
- [118] Prajapati, S., Bhakuni, V., Babu, K. J., Jain, S. K.  
Alkaline unfolding and salt-induced folding of bovine liver catalase at high pH  
Eur. J. Biochem. 255 **1** (1998), 178-184.
- [119] McNay, J. L. M., O'Connel, J. P., Fernandez, E. J.  
Protein Unfolding During Reversed-Phase Chromatography: II. Role of Salt  
Type and Ionic Strength  
Biotechnol Bioeng. 76 **3** (2001), 233-240.
- [120] Purcell, A. W., Aguilar, M.-I., Hearn, M. T. W.  
Probing the Binding Behavior and Conformational States of Globular Proteins in  
Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography  
Anal. Chem. 71 **13** (1999), 2440-2451.

- [121] Herrmann, T.  
Proteinadsorption: Isothermen und Struktur  
Diplomarbeit, Braunschweig **2003**, 68-75.
- [122] Chattopadhyay, K., Mazumdar, S.  
Stabilization of Partially Folded States of Cytochrome C in Aqueous Surfactant: Effects of Ionic and Hydrophobic Interactions  
Biochemistry 42 **49** (2003), 14606-14613.
- [123] Santos, J. H., Matsuda, N., Qi, Z.-M., Yoshida, T., Takatsu, A.  
Adsorption Behaviour of Cytochrome c, Myoglobin and Hemoglobin in a Quarz Surface Probed Using Slab Optical Waveguide (SOWG) Spectroscopy  
Anal. Sciences 19 **2** (2003), 199-204.
- [124] Cheng, Y.-Y., Lin, S. H., Chang, H.-C., Su, M.-C.  
Probing Adsorption, Orientation and Conformational Changes of Cytochrome c on Fused Silica Surfaces with the Soret Band  
J. Phys. Chem. A 107 **49** (2003), 10687-10694.
- [125] Chen, E., Goldbeck, R. A., Kliger, D. S.  
The Earliest Events in Protein Folding: A Structural Requirement for Ultrafast Folding in Cytochrome c  
J. Am. Chem. Soc. 126 **36** (2004), 11175-11181.
- [126] Xu, W., Zhou, H., Regnier, F. E.  
Regio-Specific Adsorption of Cytochrome c on Negatively Charged Surfaces  
Anal. Chem. 75 **8** (2003), 1931-1940.
- [127] Cuppett, C. M., Doneski, L. J., Wirth, M. J.  
Irreversible Adsorption of Lysozyme to Polished Marks on Silica  
Langmuir 16 **18** (2000), 7279-7284.
- [128] Gadgil, H., Ren, D., Rainville, P., Warren, B., Baynham, M., Mallet, C., Mazzeo, J., Russel, R.  
SES-MS analysis of aggregates in protein mixtures  
LC/GC Europe Applications Notebook (2003), 10-11.
- [129] Prakash, K., Prajapati, S., Ahmad, A., Jain, S. K., Bhakuni, V.  
Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase  
Prot. Sci. 11 **1** (2002), 46-57.
- [130] Dong, A., Meyer, J. D., Kendrick, B. S., Manning, M. C., Carpenter, J. F.  
Effect of Secondary Structure on the Activity of Enzymes Suspended in Organic Solvents  
Arch. Of Biochemistry and Biophysics 334 (1996), 406-414.
- [131] Roy, I., Gupta, M. N.  
Freeze-drying of proteins: some emerging concerns  
Biotechnol. Appl. Biochem. 39 (2004), 165-177.
- [132] Burova, T. V., Grinberg, N. V., Visschers, R. W., Grinberg, V. Y., de Kruif, C. G.  
Thermodynamic stability of porcine  $\beta$ -lactoglobulin: A structural relevance  
Eur. J. Biochem. 269 **16** (2002), 3958-3968.
- [133] Skelsey, K. R., Bushey, M. M.  
Capillary Electrophoretic Monitoring of the Folding and Unfolding of  $\beta$ -Lactoglobulin B  
J. Chromatogr. Sci. 34 (1996), 85-91.

- [134] Dong, A., Matssura, J., Allison, S. D., Chrisman, E., Manning, M. C., Carpenter, J. F.  
Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences in beta-lactoglobulin A and B  
*Biochemistry* 35 **5** (1996), 1450-1457.
- [135] Constans, A.  
Protein Purification I: Liquid Chromatography  
*The Scientist* 16 **2** (2002), 40.
- [136] Alizadeh-Pasdar, N., Li-Chan, E. C. Y.  
Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes  
*J. Agric. Food Chem.* 48 **2** (2000) 328-334.
- [137] Lloyd, D. K., Wätzig, H.  
Sodium dodecyl sulfate solution as an effective between-run rinse in capillary electrophoresis of samples from biological matrices  
*J. Chromatogr. A* 663 **2** (1995), 400-405.
- [138] Graf, M., Galera, R., Wätzig, H.  
Protein adsorption in fused silica and polyacrylamide-coated capillaries  
*Electrophoresis* 26 **12** (2005), 2409-2417.
- [139] Stutz, H., Wallner, M., Malissa, Jr. H., Bordin, G., Rodriguez, A. R.  
Detection of coexisting protein conformations in capillary zone electrophoresis subsequent to transient contact with sodium dodecyl sulfate solutions  
*Electrophoresis* 26 **6** (2005), 1089-1105.
- [140] Huntington, J. A., Stein, P. E.  
Structure and properties of ovalbumin  
*J. Chromatogr. B* 756 **1-2** (2001), 189-198.
- [141] De Groot, J., Jongh, H. H. J.  
The presence of heat-stable conformers of ovalbumin affects properties of thermally formed aggregates  
*Prot. Eng.* 16 **12** (2003), 1035-1040.
- [142] Kudryashova, E. V., Meinders, M. B. J., Visser, A. J. W. G., van Hoek, A., de Jongh, H. H. J.  
Structure and dynamics of egg white ovalbumin adsorbed at the air/water interface  
*Eur. Biophys. J.* 32 **6** (2003), 553-562.
- [143] Fernandez-Diaz, M. D., Barsotti, L., Dumay, E., Cheftel, J. C.  
Effects of Pulsed Electric Fields on Ovalbumin Solutions and Dialyzed Egg White  
*J. Agric. Food Chem.* 48 **6** (2000), 2332-2339.
- [144] Kakehi, K., Honda, S.  
Analysis of glycoproteins, glycopeptides and glycoprotein-derived oligosaccharides by high-performance capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* 720 **1-2** (1996), 377-393.
- [145] Pikal-Cleland, K. A., Carpenter, J. F.  
Lyophilization induced protein denaturation in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric  $\beta$ -galactosidase  
*J. Pharm. Science* 90 **9** (2001), 1255-1268.

- [146] Kreigaard, L., Frokjaer, S., Flink, J. M., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.  
Effects of additives on the stability of Humicola lanugiosa Lipase  
J. Pharm. Science 88 **3** (1999), 281-290.
- [147] Dong, A., Meyer, J. D., Kendrick, B. S., Manning, M. C., Carpenter, J. F.  
Effect of Secondary Structure on the Activity of Enzymes Suspended in Organic  
Solvents  
Arch. Of Biochemistry and Biophysics 334 (1996), 406-414.
- [148] Griebenow, K., Klibanov, A. M.  
Lyophilization induced reversible changes in the secondary structure of pro-  
teins  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 **24** (1995), 10969-10976.
- [149] Zhang, M. Z., Pikal, K., Nguyen, T., Arakawa, T., Prestrelski, S. J.  
The effect of the reconstitution medium and aggregation of lyophilized recom-  
binant interleukin-2 and ribonuclease A  
Pharmaceutical Research 13 **4** (1996), 43-646.
- [150] Zhou, D., Wang, X., Birch, L., Rayment, T., Abell, C.  
AFM Study on Protein Immobilization on Charged Surfaces at the Nanoscale:  
Toward the fabrication of Three-Dimensional Protein Nanostructures  
Langmuir 19 **25** (2003), 10557-10652.
- [151] Altria, K. D.  
Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards  
LC-GC Europe 20 **9** (2002), 588-594.



## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

### 9.1 Catalase

#### 9.1.1 Catalase pH 5,00

CATA-090205	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	21,54	25,0	6,374	5,855	0,791
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	14,34	25,0	4,548	4,178	0,527
Catalase	47,14	5,0	0,327	0,301	17,320

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ] CH <sub>3</sub> COOH	m [mg] CH <sub>3</sub> COONa	n [mmol] CH <sub>3</sub> COOH	n [mmol] CH <sub>3</sub> COONa
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	5,00	98.137	262.55	1.800	3.200
ist	5.01	100	262.53	1.755	3.200

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml

ist: 226,53 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	57
P Protein	30	12	30	25	20.00	57
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	40.00	57

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	3,334	3,317	3,350	0,046	1,380	0,00212
	P	Melamin	8,153	6,791	9,515	3,806	46,677	14,48251
	K2	Melamin	15,383	15,370	15,396	0,036	0,233	0,00128
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	95,726	94,609	96,842	3,120	3,259	9,73249
	P	Melamin	235,526	194,821	276,230	113,751	48,297	12939,400
	K2	Melamin	479,377	474,824	483,930	12,724	2,654	161,89922
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	28,714	28,439	28,990	0,771	2,684	0,59378
	P	Melamin	28,694	28,384	29,004	0,866	3,016	0,74917
	K2	Melamin	31,163	30,870	31,456	0,819	2,629	0,67108
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,795	4,765	4,825	0,084	1,747	0,00702
	P	Acetanilid	9,467	7,448	11,487	3,855	40,720	14,86150
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	53,484	52,745	54,223	2,065	3,862	4,26575
	P	Acetanilid	99,984	80,835	119,133	36,557	36,563	1336,41124
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	11,152	11,041	11,263	0,311	2,788	0,09664
	P	Acetanilid	10,776	10,318	11,233	0,873	8,099	0,76156
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,005	3,981	4,030	0,068	1,695	0,00461
	P	Acetanilid	2,333	1,886	2,780	0,853	36,571	0,72810
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000
t <sub>Mig</sub> [min]		Catalase	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		Catalase	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Catalase	-	-	-	-	-	-

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

### 9.1.2 Catalase pH 5,50

CATA-210205	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,95	5,0	7,324	6,728	0,909
Neostigmin	25,87	5,0	17,065	15,675	4,753
Catalase	44,71	5,0	0,311	0,285	16,427

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ] CH <sub>3</sub> COOH	m [mg] CH <sub>3</sub> COONa	n [mmol] CH <sub>3</sub> COOH	n [mmol] CH <sub>3</sub> COONa
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	5,50	82,33	696,54	1,510	8,490
ist	5,52	83,00	696,70	1,457	8,492

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,00ml  
ist: 89,90 mg/10,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6,00	62
P Protein	30	12	30	25	20,00	62
K2 Kontrolle 2	18	12	30	25	30,00	62

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,777	2,763	2,792	0,040	1,444	0,0016
	P	Neostigmin	4,523	4,138	4,908	1,076	23,780	1,1571
	K2	Neostigmin	6,102	6,062	6,142	0,086	1,413	0,0074
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	83,161	82,841	83,481	0,894	1,075	0,7997
	P	Neostigmin	112,978	104,342	121,614	24,133	21,361	582,3935
	K2	Neostigmin	170,233	167,697	172,768	5,488	3,224	30,1188
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	29,949	29,749	30,148	0,556	1,857	0,3094
	P	Neostigmin	25,127	24,776	25,478	0,980	3,899	0,9601
	K2	Neostigmin	27,897	27,553	28,241	0,745	2,671	0,5552
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,485	4,451	4,520	0,096	2,142	0,0092
	P	Acetanilid	9,568	7,948	11,187	3,962	41,411	15,6979
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	58,624	58,290	58,958	0,933	1,591	0,8705
	P	Acetanilid	92,635	77,256	108,014	37,631	40,623	1416,0853
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	13,076	12,943	13,210	0,373	2,853	0,1392
	P	Acetanilid	9,846	9,353	10,338	1,205	12,243	1,4530
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,282	4,250	4,315	0,092	2,138	0,0084
	P	Acetanilid	2,329	1,973	2,686	0,872	37,436	0,7604
		Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
t <sub>Mig</sub> [min]		Catalase	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		Catalase	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Catalase	-	-	-	-	-	-

### 9.1.3 Catalase pH 6,00

CATA-141204	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	8,97	10,0	6,636	6,096	0,824
Neostigmin	49,58	10,0	16,352	15,020	4,554
Catalase	43,09	5,0	0,299	0,275	15,832





## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
DRR 05A	50	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	8.00	68
P Protein	30	12	30	25	15.00	68
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	10.00	68

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,407	2,401	2,413	0,017	0,687	0,00027
	P	Neostigmin	2,750	2,700	2,801	0,142	5,167	0,02020
	K2	Neostigmin	2,882	2,869	2,896	0,037	1,291	0,00139
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	124,821	123,456	126,187	3,816	3,057	14,56093
	P	Neostigmin	135,781	133,026	138,536	7,700	5,671	59,28561
	K2	Neostigmin	132,709	123,802	141,615	24,889	18,755	619,46662
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	51,856	51,372	52,340	1,352	2,608	1,82891
	P	Neostigmin	49,365	48,989	49,740	1,049	2,124	1,09985
	K2	Neostigmin	46,132	42,969	49,295	8,840	19,162	78,13966
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	3,989	3,971	4,008	0,052	1,296	0,00267
	P	Acetanilid	5,064	4,893	5,235	0,478	9,447	0,22886
	K2	Acetanilid	5,437	5,398	5,475	0,108	1,982	0,01161
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	80,971	79,915	82,028	2,954	3,648	8,72328
	P	Acetanilid	98,058	94,872	101,244	8,904	9,080	79,28008
	K2	Acetanilid	96,216	89,456	102,977	18,893	19,636	356,93246
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	20,292	20,105	20,479	0,522	2,573	0,27253
	P	Acetanilid	19,375	19,201	19,549	0,486	2,509	0,23627
	K2	Acetanilid	17,743	16,472	19,014	3,552	20,022	12,62011
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,814	4,791	4,836	0,062	1,286	0,00383
	P	Acetanilid	3,826	3,692	3,959	0,373	9,757	0,13932
	K2	Acetanilid	3,533	3,508	3,558	0,069	1,956	0,00477
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Catalase	6,337	6,058	6,617	0,781	12,321	0,60966
Fläche [AU·min]		Catalase	66,632	64,939	68,324	4,730	7,099	22,37360
korr. Fläche [AU]		Catalase	10,687	10,106	11,267	1,622	15,176	2,63005

### 9.1.5 Catalase pH 7,00

CATA-011104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,17	10,00	7,524	6,911	0,934
Neostigmin	50,68	10,00	16,715	15,354	4,655
Catalase	45,13	5,00	0,313	0,288	16,582

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	7,00	421,40	339,42	3,096	1,907

NaCl-Lsg 154 mmol · ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml

ist: 225,09 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	93
P Protein	30	12	30	25	15.00	93
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	8.00	93

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,072	2,064	2,080	0,022	1,080	0,00050
	P	Neostigmin	2,302	2,269	2,334	0,091	3,955	0,00829
	K2	Neostigmin	2,278	2,260	2,295	0,049	2,159	0,00242
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	40,905	40,725	41,086	0,505	1,234	0,25463
	P	Neostigmin	50,890	39,118	62,663	32,899	64,647	1082,35899
	K2	Neostigmin	42,629	42,417	42,841	0,592	1,390	0,35089
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	19,747	19,675	19,819	0,201	1,018	0,04039
	P	Neostigmin	22,046	17,043	27,048	13,980	63,414	195,43779
	K2	Neostigmin	18,724	18,560	18,888	0,458	2,448	0,21013
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,055	3,039	3,072	0,047	1,525	0,00217
	P	Acetanilid	3,534	3,460	3,608	0,207	5,865	0,04296
	K2	Acetanilid	3,505	3,472	3,539	0,093	2,657	0,00867
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	24,470	24,303	24,637	0,468	1,912	0,21885
	P	Acetanilid	26,209	25,012	27,407	3,347	12,772	11,20543
	K2	Acetanilid	26,055	25,893	26,217	0,453	1,738	0,20508
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	8,009	7,968	8,050	0,114	1,427	0,01306
	P	Acetanilid	7,407	7,136	7,678	0,757	10,216	0,57254
	K2	Acetanilid	7,438	7,359	7,516	0,219	2,951	0,04818
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	6,285	6,251	6,319	0,094	1,498	0,00887
	P	Acetanilid	5,451	5,334	5,568	0,326	5,987	0,10651
		Acetanilid	5,481	5,430	5,532	0,142	2,586	0,02009
t <sub>Mig</sub> [min]		Catalase	4,998	4,817	5,179	0,506	10,119	0,25576
Fläche [AU·min]		Catalase	118,860	102,081	135,640	46,891	39,450	2198,73355
korr. Fläche [AU]		Catalase	39,849	34,678	45,021	14,452	36,267	208,86990

### 9.1.6 Catalase pH 8,00

CATA-021104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,86	10,00	7,30	6,700	0,906
Neostigmin	50,88	10,00	16,78	15,414	4,674
Catalase	47,00	5,00	0,33	0,300	17,269

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	8,00	94,96	765,76	0,70	4,30
ist	8,00	95,24	766,13	0,70	4,30

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup>    soll: 225,00 mg/25,00ml  
   ist: 225,28 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	102
P Protein	30	12	30	25	10.00	102
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	102

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,783	1,780	1,786	0,008	0,452	0,00007
	P	Neostigmin	1,923	1,906	1,940	0,048	2,510	0,00233
	K2	Neostigmin	1,981	1,968	1,993	0,035	1,785	0,00125
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	39,134	38,925	39,344	0,586	1,498	0,34372
	P	Neostigmin	40,663	40,308	41,018	0,991	2,437	0,98188
	K2	Neostigmin	42,614	42,370	42,859	0,684	1,605	0,46795
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	21,945	21,814	22,077	0,367	1,673	0,13486
	P	Neostigmin	21,144	21,071	21,218	0,206	0,976	0,04255
	K2	Neostigmin	21,517	21,390	21,645	0,357	1,657	0,12716

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,595	2,592	2,598	0,009	0,347	0,00008
	P	Acetanilid	2,892	2,851	2,932	0,114	3,929	0,01291
	K2	Acetanilid	2,987	2,963	3,011	0,066	2,212	0,00436
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	19,737	19,593	19,882	0,404	2,046	0,16300
	P	Acetanilid	21,378	21,049	21,707	0,919	4,300	0,84516
	K2	Acetanilid	22,495	22,298	22,691	0,549	2,441	0,30159
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,606	7,552	7,660	0,150	1,969	0,02243
	P	Acetanilid	7,392	7,355	7,430	0,105	1,421	0,01104
	K2	Acetanilid	7,532	7,495	7,568	0,103	1,366	0,01059
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	7,399	7,390	7,408	0,026	0,347	0,00066
	P	Acetanilid	6,650	6,554	6,745	0,266	4,005	0,07091
	K2	Acetanilid	6,431	6,380	6,483	0,143	2,231	0,02059
t <sub>Mig</sub> [min]	Catalase		3,854	3,767	3,941	0,243	6,297	0,05890
Fläche [AU·min]	Catalase		107,275	103,881	110,669	9,485	8,842	89,97008
korr. Fläche [AU]	Catalase		27,796	27,454	28,139	0,957	3,442	0,91540

### 9.1.7 Catalase pH 9,20

CATA-051104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,48	10,00	7,753	7,122	0,963
Neostigmin	49,89	10,00	16,455	15,114	4,583
Catalase	50,09	5,00	0,348	0,320	18,404

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup>		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	953,43	5,000	5,000
ist	9,20	0,00	953,45	5,000	5,000

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml  
ist: 225,37 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	102
P Protein	30	12	30	25	10.00	102
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	102

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,783	1,780	1,786	0,008	0,452	0,00007
	P	Neostigmin	1,923	1,906	1,940	0,048	2,510	0,00233
	K2	Neostigmin	1,981	1,968	1,993	0,035	1,785	0,00125
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	39,134	38,925	39,344	0,586	1,498	0,34372
	P	Neostigmin	40,663	40,308	41,018	0,991	2,437	0,98188
	K2	Neostigmin	42,614	42,370	42,859	0,684	1,605	0,46795
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	21,945	21,814	22,077	0,367	1,673	0,13486
	P	Neostigmin	21,144	21,071	21,218	0,206	0,976	0,04255
	K2	Neostigmin	21,517	21,390	21,645	0,357	1,657	0,12716
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,595	2,592	2,598	0,009	0,347	0,00008
	P	Acetanilid	2,892	2,851	2,932	0,114	3,929	0,01291
	K2	Acetanilid	2,987	2,963	3,011	0,066	2,212	0,00436
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	19,737	19,593	19,882	0,404	2,046	0,16300
	P	Acetanilid	21,378	21,049	21,707	0,919	4,300	0,84516
	K2	Acetanilid	22,495	22,298	22,691	0,549	2,441	0,30159
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,606	7,552	7,660	0,150	1,969	0,02243
	P	Acetanilid	7,392	7,355	7,430	0,105	1,421	0,01104
	K2	Acetanilid	7,532	7,495	7,568	0,103	1,366	0,01059

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	7,399	7,390	7,408	0,026	0,347	0,00066
	P	Acetanilid	6,650	6,554	6,745	0,266	4,005	0,07091
	K2	Acetanilid	6,431	6,380	6,483	0,143	2,231	0,02059
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Catalase	3,854	3,767	3,941	0,243	6,297	0,05890
Fläche [AU·min]		Catalase	107,275	103,881	110,669	9,485	8,842	89,97008
korr. Fläche [AU]		Catalase	27,796	27,454	28,139	0,957	3,442	0,91540

### 9.1.8 Catalase pH 9,20

CATA-051104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,48	10,00	7,753	7,122	0,963
Neostigmin	49,89	10,00	16,455	15,114	4,583
Catalase	50,09	5,00	0,348	0,320	18,404

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	953,43	5,000	5,000
ist	9,20	0,00	953,45	5,000	5,000

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml

ist: 225,37 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	37
P Protein	30	12	30	25	6.00	37
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	37

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,191	2,190	2,193	0,004	0,172	0,00001
	P	Neostigmin	2,667	2,582	2,753	0,234	8,789	0,05496
	K2	Neostigmin	2,960	2,953	2,966	0,017	0,585	0,00030
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	44,546	44,321	44,770	0,627	1,407	0,39276
	P	Neostigmin	54,062	52,445	55,678	4,441	8,215	19,72445
	K2	Neostigmin	58,108	57,770	58,447	0,946	1,628	0,89482
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	20,327	20,223	20,432	0,293	1,440	0,08562
	P	Neostigmin	20,282	20,131	20,433	0,414	2,043	0,17165
	K2	Neostigmin	19,634	19,541	19,726	0,258	1,316	0,06674
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	3,152	3,150	3,154	0,005	0,154	0,00002
	P	Acetanilid	4,237	4,031	4,444	0,568	13,409	0,32286
	K2	Acetanilid	4,974	4,954	4,994	0,056	1,121	0,00311
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	25,597	25,436	25,758	0,450	1,756	0,20212
	P	Acetanilid	34,151	32,520	35,782	4,481	13,121	20,07935
	K2	Acetanilid	37,946	37,680	38,213	0,745	1,962	0,55446
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	8,122	8,069	8,174	0,146	1,799	0,02135
	P	Acetanilid	8,066	7,982	8,150	0,231	2,867	0,05347
	K2	Acetanilid	7,629	7,593	7,664	0,098	1,287	0,00964
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	6,092	6,088	6,095	0,009	0,154	0,00009
	P	Acetanilid	4,614	4,379	4,848	0,644	13,953	0,41444
	K2	Acetanilid	3,861	3,845	3,876	0,043	1,108	0,00183
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Catalase	4,992	4,619	5,365	0,601	12,041	0,36130
Fläche [AU·min]		Catalase	93,246	72,576	113,917	33,351	35,766	1112,27722
korr. Fläche [AU]		Catalase	19,639	14,074	25,204	8,979	45,721	80,62361

## 9.1.9 Catalase pH 9,20

CATA-030505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,05	10,00	3,348	3,075	0,416
Neostigmin	58,87	10,00	9,708	8,917	2,704
Catalase	24,39	5,00	0,169	0,156	8,961

Borat-Puffer	pH	m [mg] B(OH) <sub>3</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	n [mmol] H[B(OH) <sub>4</sub> ]	n [mmol] [B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
100 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	9,20	0,00	953,43	5,000	5,000
ist	9,20	0,00	955,42	5,010	5,010

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml

ist: 220,30 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	36
P Protein	30	12	30	25	10.00	36
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	36

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,071	2,066	2,075	0,013	0,648	0,00018
	P	Neostigmin	2,290	2,253	2,327	0,104	4,554	0,01087
	K2	Neostigmin	2,339	2,327	2,352	0,034	1,464	0,00117
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	33,644	33,511	33,777	0,372	1,105	0,13817
	P	Neostigmin	35,057	34,338	35,775	2,008	5,727	4,03019
	K2	Neostigmin	36,989	36,767	37,212	0,622	1,680	0,38628
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	16,248	16,178	16,319	0,197	1,214	0,03892
	P	Neostigmin	15,304	15,182	15,425	0,339	2,216	0,11503
	K2	Neostigmin	15,812	15,738	15,885	0,204	1,292	0,04174
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,953	2,946	2,960	0,020	0,684	0,00041
	P	Acetanilid	3,421	3,340	3,502	0,227	6,626	0,05140
	K2	Acetanilid	3,524	3,494	3,554	0,083	2,360	0,00691
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	14,861	14,820	14,903	0,116	0,782	0,01349
	P	Acetanilid	15,975	15,592	16,357	1,070	6,696	1,14418
	K2	Acetanilid	17,328	17,190	17,466	0,385	2,224	0,14854
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	5,033	5,012	5,054	0,059	1,177	0,00351
	P	Acetanilid	4,670	4,641	4,698	0,080	1,714	0,00640
	K2	Acetanilid	4,918	4,900	4,936	0,050	1,025	0,00254
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	6,503	6,487	6,519	0,045	0,687	0,00200
	P	Acetanilid	5,636	5,499	5,773	0,383	6,800	0,14691
		Acetanilid	5,452	5,406	5,497	0,127	2,333	0,01618
t <sub>Mig</sub> [min]		Catalase	4,864	4,672	5,057	0,538	11,058	0,28931
Fläche [AU·min]		Catalase	70,433	66,906	73,959	9,855	13,992	97,12624
korr. Fläche [AU]		Catalase	14,447	14,173	14,721	0,765	5,295	0,58517

## 9.1.10 Catalase pH 9,17

CATA-100505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,17	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,75	5,00	7,028	6,456	0,873
Neostigmin	22,01	5,00	14,519	13,336	4,043
Catalase	44,04	5,00	0,306	0,281	16,181

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	n [mmol] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	9,20	6,89	880,94	0,051	4,949
ist	9,17	7,35	885,00	0,054	4,972

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 450,00 mg/50,00ml  
 ist: 449,29 mg/50,00ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	6,00	121
P	Protein	30	12	30	25	8,00	121
K2	Kontrolle 2	30	12	30	25	8,00	121

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,858	1,850	1,865	0,021	1,129	0,00044
	P	Neostigmin	1,918	1,909	1,927	0,025	1,322	0,00064
	K2	Neostigmin	1,925	1,919	1,930	0,016	0,838	0,00026
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	43,858	43,629	44,087	0,640	1,459	0,40941
	P	Neostigmin	43,873	43,457	44,288	1,160	2,645	1,34675
	K2	Neostigmin	44,826	44,647	45,004	0,499	1,112	0,24865
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	23,609	23,515	23,703	0,264	1,118	0,06961
	P	Neostigmin	22,868	22,711	23,025	0,439	1,920	0,19284
	K2	Neostigmin	23,290	23,216	23,364	0,207	0,887	0,04272
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,700	2,685	2,714	0,041	1,505	0,00165
	P	Acetanilid	2,812	2,797	2,826	0,040	1,431	0,00162
	K2	Acetanilid	2,809	2,798	2,819	0,028	0,999	0,00079
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	26,184	25,975	26,392	0,584	2,230	0,34080
	P	Acetanilid	26,084	25,805	26,363	0,779	2,985	0,60642
	K2	Acetanilid	27,268	27,103	27,434	0,463	1,698	0,21429
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	9,698	9,647	9,750	0,144	1,488	0,02084
	P	Acetanilid	9,275	9,204	9,347	0,200	2,161	0,04017
	K2	Acetanilid	9,709	9,660	9,759	0,138	1,425	0,01915
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	7,113	7,075	7,152	0,107	1,505	0,01146
	P	Acetanilid	6,830	6,795	6,865	0,098	1,432	0,00957
	K2	Acetanilid	6,837	6,813	6,861	0,068	0,996	0,00463
t <sub>Mig</sub> [min]		Catalase	3,775	3,748	3,803	0,076	2,010	0,00576
Fläche [AU·min]		Catalase	151,581	143,425	159,736	22,407	14,782	502,06930
korr. Fläche [AU]		Catalase	40,172	37,974	42,370	6,040	15,034	36,47661

### 9.1.11 Catalase pH 9,19

CATA-160505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,19	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,75	5,00	7,028	6,456	0,873
Neostigmin	22,01	5,00	14,519	13,336	4,043
Catalase	44,04	5,00	0,306	0,281	16,181

Puffer	pH	m [mg] B(OH) <sub>3</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	n [mmol] H[B(OH) <sub>4</sub> ]	n [mmol] Na[B(OH) <sub>4</sub> ]
60 mmol · l <sup>-1</sup>					
		0,00	478,86	0,00	50,23
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
		1,47	176,63	11	9,92

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 450,00 mg/50,00ml  
 ist: 449,29 mg/50,00ml

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	121
P Protein	30	12	30	25	10.00	121
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	121

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,082	2,078	2,085	0,011	0,523	0,00012
	P	Neostigmin	2,176	2,167	2,185	0,026	1,197	0,00068
	K2	Neostigmin	2,122	2,107	2,136	0,041	1,950	0,00171
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	32,304	32,151	32,457	0,428	1,324	0,18300
	P	Neostigmin	32,146	31,843	32,448	0,845	2,629	0,71437
	K2	Neostigmin	31,924	31,656	32,192	0,750	2,349	0,56223
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	15,519	15,460	15,577	0,164	1,056	0,02683
	P	Neostigmin	14,776	14,619	14,932	0,438	2,965	0,19188
	K2	Neostigmin	15,050	14,923	15,178	0,356	2,365	0,12669
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	2,863	2,858	2,869	0,015	0,521	0,00022
	P	Acetanilid	3,044	3,026	3,062	0,050	1,652	0,00253
	K2	Acetanilid	2,940	2,916	2,964	0,066	2,262	0,00442
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	20,075	19,951	20,200	0,347	1,728	0,12040
	P	Acetanilid	20,260	20,023	20,498	0,663	3,273	0,43964
	K2	Acetanilid	20,376	20,175	20,577	0,562	2,759	0,31601
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,011	6,976	7,045	0,097	1,379	0,00935
	P	Acetanilid	6,656	6,575	6,738	0,228	3,423	0,05191
	K2	Acetanilid	6,932	6,865	7,000	0,188	2,715	0,03542
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	6,706	6,693	6,718	0,035	0,524	0,00123
	P	Acetanilid	6,309	6,270	6,347	0,107	1,690	0,01137
		Acetanilid	6,534	6,480	6,588	0,151	2,314	0,02286
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Catalase	4,120	4,085	4,155	0,098	2,370	0,00953
Fläche [AU·min]		Catalase	98,914	97,277	100,551	4,576	4,626	20,93798
korr. Fläche [AU]		Catalase	24,003	23,725	24,281	0,776	3,232	0,60191



## 9.2 Cytochrom C

### 9.2.1 Cytochrom C pH 7,00

CYTO-170703	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23,02	25,00	8,175	7,509	1,015
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40,20	25,00	10,200	9,369	1,182
Cytochrom C	23,55	10,00	0,644	0,592	6,922

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	7,00	420,54	339,64	3,090	1,908

NaCl-Lsg 154 mmol · ml<sup>-1</sup> soll: 450,00 mg/50,00ml  
 ist: 449,29 mg/50,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	15	12	25	25	6.00	104
P Protein	30	12	25	25	20.00	104
K2 Kontrolle 2	15	12	25	25	6.00	104

Substanz			$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	2,332	2,316	2,349	0,032	1,385	0,00104
	P	Melamin	8,701	6,294	11,107	4,755	54,651	22,61096
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU · min]	K1	Melamin	200,776	199,445	202,106	2,629	1,309	6,91151
	P	Melamin	483,347	409,616	557,078	145,696	30,143	21227,3750
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	86,109	85,130	87,087	1,934	2,246	3,73946
	P	Melamin	67,883	55,360	80,407	24,747	36,455	612,41400
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Melamin	8,234	8,177	8,291	0,113	1,377	0,01286
	P	Melamin	2,880	2,053	3,706	1,633	56,709	2,66653
		Melamin	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU · min]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-

### 9.2.2 Cytochrom C pH 8,40

CYTO-070703	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23,02	25,0	6,812	7,822	1,057
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40,20	25,0	12,750	14,639	1,846
Cytochrom C	15,25	5,00	1,043	1,197	14,008

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup> (0,2 l)		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1006,42	710,62	19,943	3,727

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	15	18	25	25	10.00	33
P Protein	10	18	25	25	30.00	33
K2 Kontrolle 2	10	18	25	25	30.00	33

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Melamin	2,218	2,206	2,231	0,024	1,089	0,00058
	P	Melamin	8,922	1,539	16,304	9,966	111,701	99,31330
	K2	Melamin	15,706	14,074	17,338	2,633	16,763	6,93229
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	202,531	201,690	203,371	1,661	0,820	2,75748
	P	Melamin	338,563	240,954	436,171	131,762	38,918	17361,1777
	K2	Melamin	1702,316	1624,735	1779,897	125,172	7,353	15668,0385
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	91,307	90,771	91,843	1,060	1,160	1,12267
	P	Melamin	71,125	43,631	98,619	37,114	52,182	1377,46994
	K2	Melamin	109,976	102,562	117,389	11,961	10,876	143,05595
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Melamin	8,656	8,608	8,704	0,095	1,102	0,00911
	P	Melamin	4,181	2,266	6,096	2,585	61,829	6,68334
	P	Melamin	1,250	1,137	1,362	0,182	14,527	0,03295
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	-	-	-	-	-	-

### 9.2.3 Cytochrom C pH 8,40

CYTO-090703	Einwaage	$V_{\text{int. Sta.}}$	C Probe	n Inject	m Inject
pH 8,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23,02	25,0	6,812	7,822	1,057
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40,20	25,0	12,750	14,639	1,846
Cytochrom C	15,25	5,00	1,043	1,197	14,008

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> (0,2 l)		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990.26	761.23	20.008	3.992
ist	8,40	1006.42	710.62	19.943	3.727

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	15	18	25	25	3.00	34
P1 Protein 1	20	18	25	25	60.00	34
K2 Kontrolle 2	15	18	25	25	30.00	34
P2 Protein 2	10	18	25	25	60.00	34
K3 Kontrolle 3	10	18	25	25	30.00	34

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Melamin	2,094	2,087	2,102	0,015	0,701	0,00022
	P1	Melamin	23,122	17,716	28,527	12,022	51,994	144,52501
	K2	Melamin	18,315	17,789	18,842	1,040	5,680	1,08212
	P2	Melamin	17,394	16,878	17,910	0,833	4,789	0,69375
	K3	Melamin	14,450	14,339	14,562	0,181	1,249	0,03259

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	215,011	213,486	216,536	3,013	1,402	9,08057
	P1	Melamin	1138,570	609,474	1667,666	1176,693	103,348	1384607
	K2	Melamin	1726,641	1680,543	1772,739	91,093	5,276	8297,882
	P2	Melamin	314,177	276,658	351,695	60,534	19,267	3664,343
	K3	Melamin	1262,680	1244,580	1280,780	29,203	2,313	852,838
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	102,656	102,125	103,188	1,050	1,023	1,102
	P1	Melamin	54,076	39,128	69,025	33,245	61,477	1105,208
	K2	Melamin	94,296	93,902	94,691	0,779	0,827	0,60751
	P2	Melamin	17,956	16,334	19,577	2,617	14,573	6,84657
	K3	Melamin	87,370	86,780	87,960	0,952	1,090	0,90623
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Melamin	9,168	9,135	9,200	0,064	0,700	0,00411
	P1	Melamin	1,729	0,757	2,700	2,161	125,045	4,67180
	K2	Melamin	1,052	1,020	1,083	0,062	5,922	0,00388
	P2	Melamin	1,106	1,074	1,138	0,052	4,679	0,00268
	K3	Melamin	1,329	1,319	1,339	0,017	1,243	0,00027
t <sub>Mig</sub> [min]		Cytochrom C	5,644	5,563	5,725	0,131	2,315	0,01707
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	1385,008	1344,878	1425,138	64,748	4,675	4192,3
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	245,392	239,480	251,304	9,538	3,887	91,0
t <sub>Mig</sub> [min]		Cytochrom C	23,869	22,325	25,412	2,728	11,429	7,4
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	261,314	135,932	386,696	221,604	84,804	49108,2
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	11,984	4,606	19,362	13,040	108,813	170,0

### 9.2.4 Cytochrom C pH 9,20

CYTO-290603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23,02	25,0	6,812	7,822	1,057
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40,20	25,0	12,750	14,639	1,846
Cytochrom C	15,78	5,00	1,079	1,239	14,495

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup> (0,5 l)		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	4767,13	25,000	25,000
ist	9,20	0,00	4767,83	25,004	25,004

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	15	18	25	25	20.00	39
P Protein	30	18	25	25	20.00	39
K2 Kontrolle 2	Serie abgebrochen					

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	2,809	2,796	2,822	0,026	0,924	0,00067
	P	Melamin	10,285	9,352	11,218	2,331	22,667	5,43498
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	284,710	278,923	290,496	11,435	4,016	130,76080
	P	Melamin	541,124	504,172	578,077	92,363	17,069	8531,00924
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	101,352	99,621	103,083	3,421	3,375	11,70326
	P	Melamin	55,456	49,536	61,375	14,796	26,681	218,92351
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Melamin	6,837	6,805	6,868	0,063	0,918	0,00393
	P	Melamin	2,056	1,685	2,428	0,928	45,102	0,86027
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		Cytochrom C	4,656	4,082	5,230	1,171	25,154	1,37158
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	1077,740	944,937	1210,542	271,031	25,148	73457,5394
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	235,083	213,089	257,076	44,886	19,094	2014,77309

## 9.2.5 Cytochrom C pH 10,50

CYTO-241103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 10,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,14	10,0	6,762	7,764	1,049
Neostigmin	49,64	10,0	16,372	18,798	5,700
Cytochrom C	13,02	10,0	0,223	0,256	2,990

Borat-Puffer	pH	V [ml]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup> (0,2 l)		NaOH 1M	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	10,50	4,523	953,43	0,477	9,523
ist	10,50	4,520	951,80	0,480	9,520

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t <sub>Puf</sub> [s]	p <sub>Puf</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	30	18	25	25	20	25	4,00	47
P 1	Protein 1	30	18	25	25	20	25	20,00	47
K2	Kontrolle 2	12	18	25	25	20	25	20,00	47
P 2	Protein 2	30	18	25	25	20	25	20,00	47
K3	Kontrolle 3	10	18	25	25	20	25	20,00	47

Substanz			$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,255	1,249	1,262	0,019	1,522	0,00036
	P1	Neostigmin	1,981	1,896	2,066	0,238	12,014	0,05663
	K2	Neostigmin	2,162	2,147	2,177	0,027	1,258	0,00074
	P2	Neostigmin	2,252	2,229	2,275	0,065	2,873	0,00419
	K3	Neostigmin	2,409	2,397	2,420	0,019	0,785	0,00036
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	201,376	200,618	202,135	2,121	1,053	4,49764
	P1	Neostigmin	308,973	297,307	320,640	32,603	10,552	1062,93150
	K2	Neostigmin	339,725	338,177	341,273	2,736	0,805	7,48458
	P2	Neostigmin	360,330	357,184	363,477	8,793	2,440	77,32224
	K3	Neostigmin	367,963	365,537	370,389	3,914	1,064	15,31845
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	160,423	159,729	161,116	1,938	1,208	3,75554
	P1	Neostigmin	156,295	155,235	157,356	2,963	1,896	8,78054
	K2	Neostigmin	157,145	156,143	158,146	1,771	1,127	3,13599
	P2	Neostigmin	160,051	158,698	161,404	3,781	2,362	14,29491
	K3	Neostigmin	152,781	151,259	154,303	2,456	1,607	6,03135
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	1,766	1,757	1,775	0,026	1,464	0,00067
	P1	Acetanilid	3,616	3,383	3,850	0,653	18,062	0,42665
	K2	Acetanilid	4,140	4,089	4,191	0,090	2,168	0,00805
	P2	Acetanilid	4,467	4,406	4,528	0,171	3,823	0,02917
	K3	Acetanilid	4,828	4,810	4,846	0,030	0,612	0,00087
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	113,313	112,875	113,750	1,222	1,078	1,49332
	P1	Acetanilid	216,646	203,694	229,598	36,195	16,707	1310,10627
	K2	Acetanilid	255,981	253,806	258,156	3,844	1,502	14,77438
	P2	Acetanilid	275,535	272,989	278,081	7,114	2,582	50,60821
	K3	Acetanilid	284,192	282,394	285,990	2,901	1,021	8,41339
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	64,167	63,819	64,515	0,973	1,516	0,94640
	P1	Acetanilid	60,091	59,616	60,567	1,329	2,212	1,76647
	K2	Acetanilid	61,850	61,212	62,487	1,127	1,822	1,26959
	P2	Acetanilid	61,722	61,166	62,278	1,553	2,516	2,41122
	K3	Acetanilid	58,865	58,329	59,402	0,866	1,471	0,74942
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	10,873	10,817	10,929	0,156	1,438	0,02443
	P1	Acetanilid	5,518	5,081	5,955	1,222	22,149	1,49364
	K2	Acetanilid	4,640	4,583	4,696	0,100	2,150	0,00995
	P2	Acetanilid	4,304	4,244	4,364	0,168	3,903	0,02822
	K3	Acetanilid	3,977	3,962	3,992	0,024	0,613	0,00059

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Cytochrom C	4,638	4,361	4,916	0,736	15,858	0,54098
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	20,543	13,831	27,255	17,794	86,617	316,61091
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	4,027	2,854	5,200	3,109	77,208	9,66823
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Cytochrom C	5,639	5,557	5,721	0,229	4,068	0,05263
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	34,753	28,513	40,993	17,438	50,176	304,07211
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	6,056	5,024	7,088	2,883	47,611	8,31408

### 9.2.6 Cytochrom C pH 11,00

CYTO-130104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 11,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,42	10,0	6,969	8,002	1,082
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	13,97	10,0	5,538	6,359	0,802
Cytochrom C	13,77	10,0	0,235	0,270	3,162

Phosphat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n <sub>0</sub> [mmol]	n [mmol]
49 mmol · l <sup>-1</sup> (0,1 l)		NaOH 1M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	OH <sup>-</sup> / PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
soll	11,00	147,00	889,95	5,000	0,100
ist	11,00	145,00	871,53	4,897	0,986

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

Läufe		t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t <sub>Puf</sub> [s]	p <sub>Puf</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	30	18	25	20	25	5.00	106
P	Protein	30	18	25	20	25	10.00	106
K2	Kontrolle 2	20	18	25	20	25	10.00	106

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Melamin	3,345	3,328	3,362	0,047	1,418	0,00225
	P	Melamin	3,476	3,464	3,487	0,033	0,952	0,00109
	K2	Melamin	3,393	3,344	3,441	0,112	3,287	0,01244
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	155,769	155,140	156,397	1,757	1,128	3,08748
	P	Melamin	153,894	153,250	154,539	1,801	1,170	3,24286
	K2	Melamin	158,723	158,058	159,387	1,516	0,955	2,29950
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	46,574	46,299	46,848	0,767	1,648	0,58903
	P	Melamin	44,280	44,135	44,425	0,405	0,915	0,16398
	K2	Melamin	46,839	46,055	47,623	1,789	3,820	3,20062
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Melamin	5,741	5,712	5,770	0,081	1,414	0,00659
	P	Melamin	5,525	5,506	5,544	0,053	0,953	0,00277
		Melamin	5,665	5,581	5,749	0,192	3,383	0,03673
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Cytochrom C	4,014	4,002	4,026	0,035	0,863	0,00120
Fläche [AU·min]		Cytochrom C	24,285	24,058	24,512	0,634	2,609	0,40149
korr. Fläche [AU]		Cytochrom C	6,050	5,995	6,105	0,154	2,551	0,02382

### 9.2.7 Cytochrom C pH 11,50

CYTO-190104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 11,49	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,42	10,0	6,969	8,002	1,082
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	13,97	10,0	11,077	12,718	1,604
Cytochrom C	15,06	10,0	0,257	0,296	3,458

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	V [ $\mu$ l]	m [mg]	n <sub>0</sub> [mmol]	n [ $\mu$ mol]
120 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> (0,5 l)		NaOH 1M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	OH <sup>-</sup> / PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
soll	11,50	316,60	833,57	4,683	315,000
ist	11,49	315,00	833,72	4,683	309,030

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml  
ist: 105,20 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu$ m]	O.D. [ $\mu$ m]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

Läufe		t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t <sub>Puf</sub> [s]	p <sub>Puf</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]	
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	20	16	10.00	113
P	Protein	30	12	30	25	20	16	10.00	113
K2	Kontrolle 2	20	12	30	25	20	16	10.00	113

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	4,057	4,021	4,093	0,100	2,468	0,01003
	P	Melamin	4,384	4,297	4,470	0,241	5,501	0,05814
	K2	Melamin	4,688	4,672	4,703	0,035	0,746	0,00122
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Melamin	835,628	830,938	840,318	13,107	1,568	171,78466
	P	Melamin	857,561	851,717	863,404	16,329	1,904	266,63964
	K2	Melamin	900,247	896,259	904,236	9,100	1,011	82,81778
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	206,107	203,818	208,397	6,397	3,104	40,92338
	P	Melamin	196,032	193,230	198,835	7,832	3,995	61,33559
	K2	Melamin	192,052	191,308	192,796	1,697	0,884	2,88110
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Melamin	7,399	7,335	7,463	0,180	2,431	0,03236
	P	Melamin	6,864	6,727	7,000	0,381	5,556	0,14543
		Melamin	6,400	6,379	6,421	0,048	0,746	0,00228
t <sub>Mig</sub> [min]	Cytochrom C		5,009	4,908	5,110	0,283	5,643	0,07991
Fläche [AU $\cdot$ min]	Cytochrom C		261,311	256,627	265,994	13,088	5,009	171,30859
korr. Fläche [AU]	Cytochrom C		52,441	50,549	54,333	5,287	10,081	27,94968

## 9.3 $\beta$ -Lactoglobulin ohne Filtration

### 9.3.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,00

<b>b-LAC-160403</b>	<b>Einwaage</b>	<b>V<sub>int. Sta.</sub></b>	<b>C<sub>Probe</sub></b>	<b>n<sub>Inject</sub></b>	<b>m<sub>Inject</sub></b>
<b>pH 5,00</b>	<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[<math>\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[ng]</b>
Acetanilid	13,65	10,0	7,972	7,323	0,990
N-Butylscopolaminium-Bromid	33,77	5,00	12,107	11,121	4,898
$\beta$ -Lactoglobulin	17,22	5,00	0,397	0,364	6,660

<b>Acetat-Puffer</b>	<b>pH</b>	<b>V [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>m [mg]</b>	<b>n [mmol]</b>	<b>n [mmol]</b>
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{CH}_3\text{COOH}$	$\text{CH}_3\text{COONa}$	$\text{CH}_3\text{COOH}$	$\text{CH}_3\text{COONa}$
soll	5,00	98.137	262.55	1.800	3.200
ist	5.01	98.0	262.65	1.800	3.200

<b>Kapillarcharge</b>	<b>I.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>O.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>L<sub>ges</sub> [cm]</b>	<b>L<sub>Det</sub> [cm]</b>
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		<b>Läufe</b>	<b>t<sub>Inj</sub> [s]</b>	<b>p<sub>Inj</sub> [mbar]</b>	<b>U [kV]</b>	<b>t [min]</b>	<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>
K1	Kontrolle 1	10	15	24	25	30.00	53
P	Protein	25	15	24	25	30.00	53
K2	Kontrolle 2	7	15	24	25	30.00	53

<b>Substanz</b>			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	<b>RSD %</b>	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	N-But-Scopol	3,617	3,312	3,922	0,492	13,597	0,24185
	P	N-But-Scopol	6,481	5,974	6,989	1,294	19,964	1,67430
	K2	N-But-Scopol	5,598	5,487	5,708	0,149	2,667	0,02230
Fläche [AU·min]	K1	N-But-Scopol	17,876	14,043	21,708	6,183	34,591	38,23511
	P	N-But-Scopol	20,864	15,491	26,236	13,706	65,693	187,85427
	K2	N-But-Scopol	51,285	50,259	52,311	1,385	2,701	1,91901
korr. Fläche [AU]	K1	N-But-Scopol	5,074	3,837	6,311	1,996	39,338	3,98371
	P	N-But-Scopol	3,608	2,538	4,677	2,728	75,627	7,44414
	K2	N-But-Scopol	9,169	8,883	9,454	0,386	4,206	0,14868
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	5,884	5,720	6,047	0,251	4,261	0,06286
	P	Acetanilid	18,436	14,125	22,747	7,619	41,328	58,05168
	K2	Acetanilid	17,208	16,807	17,608	0,541	3,142	0,29240
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	26,832	21,940	31,724	7,488	27,908	56,07290
	P	Acetanilid	35,080	18,742	51,418	28,876	82,314	833,83570
	K2	Acetanilid	99,855	97,176	102,534	3,616	3,621	13,07719
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	4,608	3,679	5,538	1,423	30,872	2,02410
	P	Acetanilid	2,589	1,321	3,857	2,241	86,567	5,02379
	K2	Acetanilid	5,809	5,587	6,030	0,299	5,154	0,08962
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,268	3,180	3,357	0,135	4,128	0,01820
	P	Acetanilid	1,349	0,858	1,840	0,869	64,391	0,75453
	P	Acetanilid	1,117	1,092	1,141	0,033	2,996	0,00112
t <sub>Mig</sub> [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-

### 9.3.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00

<b>b-LAC-290103</b>	<b>Einwaage</b>	<b>V<sub>int. Sta.</sub></b>	<b>C<sub>Probe</sub></b>	<b>n<sub>Inject</sub></b>	<b>m<sub>Inject</sub></b>
<b>pH 6,00</b>	<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[<math>\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[ng]</b>
Acetanilid	11,45	10,0	5,082	3,579	0,484
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	25,61	10,0	12,184	8,580	1,082
$\beta$ -Lactoglobulin	34,40	10,0	0,376	0,265	4,845

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	641,67	51,93	4,715	0,292

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0ml  
ist: 225,03 mg/25,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
GBH 02C	46-50	353	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	15	10	34,5	25	8.00	64
P	Protein	25	10	34,5	25	8.00	64
K2	Kontrolle 2						

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	4,942	4,908	4,977	0,069	1,393	0,00474
	P	Melamin	6,645	6,112	7,178	0,902	13,580	0,81425
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	172,179	168,807	175,551	6,664	3,870	44,40242
	P	Melamin	270,109	235,561	304,656	55,740	20,636	3106,97635
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	29,024	28,599	29,449	0,840	2,894	0,70545
	P	Melamin	34,288	32,076	36,499	3,568	10,405	12,72880
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	5,722	5,673	5,771	0,097	1,691	0,00936
	P	Acetanilid	6,843	6,458	7,227	0,438	6,405	0,19206
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	24,108	23,587	24,629	1,030	4,272	1,06061
	P	Acetanilid	27,155	24,648	29,662	2,860	10,531	8,17818
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	3,512	3,439	3,584	0,143	4,084	0,02056
	P	Acetanilid	3,301	3,144	3,458	0,179	5,428	0,03211
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	3,356	3,329	3,384	0,055	1,634	0,00301
	P	Acetanilid	2,815	2,660	2,970	0,177	6,287	0,03132
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		β-Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		β-Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		β-Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-

### 9.3.3 β-Lactoglobulin pH 6,00

b-LAC-170203	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,04	10,0	4,457	3,821	0,516
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	20,93	10,0	9,957	8,536	1,077
β-Lactoglobulin	17,80	10,0	0,195	0,167	3,052

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	640,02	52,00	4,703	0,292

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48



## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

		Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
K1	Kontrolle 1	10	12	28	25	30.00	68
P	Protein	25	12	28	25	30.00	68
K2	Kontrolle 2						

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{Mig}$ [min]	K1	Melamin	4,128	4,081	4,175	0,076	1,832	0,0057
	P	Melamin	6,705	6,174	7,236	1,355	20,217	1,8374
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	111,359	109,094	113,624	3,654	3,282	13,3540
	P	Melamin	326,012	276,540	375,485	126,208	38,713	15928,5731
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	26,971	26,635	27,308	0,543	2,012	0,2944
	P	Melamin	46,956	41,903	52,008	12,888	27,448	166,1074
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
$t_{Mig}$ [min]	K1	Acetanilid	4,598	4,540	4,656	0,093	2,026	0,0087
	P	Acetanilid	9,646	8,347	10,946	3,314	34,354	10,9824
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	10,986	10,569	11,402	0,672	6,118	0,4517
	P	Acetanilid	20,317	17,853	22,781	6,286	30,939	39,5144
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	2,388	2,316	2,461	0,117	4,888	0,0136
	P	Acetanilid	2,208	1,997	2,419	0,538	24,378	0,2897
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,177	4,125	4,230	0,085	2,044	0,0073
	P	Acetanilid	2,286	1,922	2,649	0,928	40,595	0,8609
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
$t_{Mig}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	14,260	12,007	16,514	5,012	35,146	25,1194
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	102,271	75,363	129,179	59,842	58,514	3581,0952
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	7,045	5,558	8,533	3,309	46,962	10,9471

### 9.3.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

b-LAC-050403	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	12,20	10,0	5,415	6,218	0,840
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	20,65	10,0	9,824	11,280	1,423
$\beta$ -Lactoglobulin	31,51	10,0	0,345	0,396	7,236

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
K1	Kontrolle 1	10	15	24	25	30.00	72
P	Protein	25	15	24	25	30.00	72
K2	Kontrolle 2						

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{Mig}$ [min]	K1	Neostigmin	4,148	4,007	4,289	0,227	5,476	0,05158
	P	Neostigmin	4,436	4,261	4,612	0,448	10,092	0,20044
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	104,727	79,341	130,113	40,959	39,110	1677,62798
	P	Neostigmin	254,339	207,184	301,494	120,296	47,298	14471,204
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	25,664	19,066	32,262	10,645	41,479	113,32106
	P	Neostigmin	55,828	47,114	64,542	22,230	39,818	494,15577
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	4,308	4,198	4,417	0,167	3,878	0,02790
	P	Acetanilid	5,388	4,860	5,917	1,111	20,623	1,23484
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	31,383	5,992	56,774	38,865	123,841	1510,47752
	P	Acetanilid	42,703	31,518	53,887	23,528	55,098	553,58258
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,213	1,424	13,003	8,861	122,850	78,52556
	P	Acetanilid	7,595	6,047	9,143	3,257	42,883	10,60767
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF $[10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	4,463	4,353	4,573	0,168	3,764	0,02822
	P	Acetanilid	3,696	3,365	4,028	0,697	18,853	0,48567
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]	$\beta$ -Lactoglobulin		5,781	5,565	5,997	0,246	4,263	0,06073
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin		37,676	20,018	55,334	20,146	53,470	405,84519
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin		6,641	3,366	9,916	3,736	56,258	13,95844

### 9.3.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00

b-LAC-170103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n Inject	m Inject
pH 7,00	[mg]	[ml]	$[\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}]$	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,03	10,0	4,452	3,919	0,530
Neostigmin	103,28	10,0	20,438	17,991	5,455
$\beta$ -Lactoglobulin	37,28	10,0	0,408	0,359	6,563

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	7,00	420,54	339,64	3,090	1,908

NaCl-Lsg 154 mmol · ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml  
ist: 90,90 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	10	34.5	28	10.00	86
P Protein						
K2 Kontrolle 2						

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
	P	Neostigmin	2,911	2,907	2,915	0,011	0,378	0,00012
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
	P	Neostigmin	149,830	146,321	153,338	9,806	6,545	96,15282
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
	P	Neostigmin	42,896	41,893	43,898	2,802	6,532	7,85075
	K2	Neostigmin	-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
	P	Acetanilid	4,501	4,492	4,510	0,025	0,550	0,00061
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
	P	Acetanilid	37,809	37,301	38,317	1,419	3,752	2,01266
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
	P	Acetanilid	7,000	6,905	7,096	0,266	3,802	0,07083
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
	P	Acetanilid	4,266	4,258	4,274	0,023	0,540	0,00053
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	6,299	6,283	6,315	0,045	0,716	0,00204
Fläche $[\text{AU} \cdot \text{min}]$		$\beta$ -Lactoglobulin	76,763	75,728	77,798	2,892	3,767	8,36230
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	10,157	10,016	10,298	0,395	3,885	0,15567
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	6,538	6,514	6,562	0,067	1,030	0,00453
Fläche $[\text{AU} \cdot \text{min}]$		$\beta$ -Lactoglobulin	89,589	87,934	91,244	4,624	5,162	21,38558
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	11,419	11,214	11,623	0,571	5,001	0,32612

### 9.3.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 8,40

b-LAC-020103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,40	[mg]	[ml]	$[\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}]$	[pmol]	[ng]
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	21,92	10,0	10,428	11,973	1,510
$\beta$ -Lactoglobulin	37,43	10,0	0,410	0,470	8,595

Borat-Puffer	pH	B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
120 mmol · l <sup>-1</sup>	0,2 l	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
soll	8,40	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1002,65	710,62	19,943	3,727

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
GBH 02C	46-50	353	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1						
P Protein	30	18	25	25	10.00	37
K2 Kontrolle 2						

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Melamin	-	-	-	-	-	-
	P	Melamin	2,284	2,282	2,287	0,007	0,297	0,00005
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
Fläche $[\text{AU} \cdot \text{min}]$	K1	Melamin	-	-	-	-	-	-
	P	Melamin	144,697	144,029	145,366	1,868	1,291	3,48919
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	-	-	-	-	-	-
	P	Melamin	63,343	63,061	63,626	0,790	1,247	0,62378
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Melamin	-	-	-	-	-	-
	P	Melamin	8,405	8,396	8,414	0,025	0,296	0,00062
	K2	Melamin	-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	3,048	3,044	3,052	0,012	0,381	0,00013
Fläche $[\text{AU} \cdot \text{min}]$		$\beta$ -Lactoglobulin	66,491	65,933	67,048	1,559	2,344	2,42963
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	21,817	21,621	22,014	0,549	2,515	0,30113

## 9.4 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren 1

### 9.4.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

BR-LAC-210503	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	8,90	10,0	6,584	6,048	0,818
Neostigmin	49,99	10,0	16,488	15,145	4,592
N-Butylscopolaminiumbromid	30,44	10,0	9,095	8,354	3,679

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,51	570,35	148,36	4,191	0,834

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Protein	30	20	30	15	90	15.00	85

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Neostigmin	3,670	3,574	3,767	0,260	7,089	0,06771
Fläche [AU $\cdot$ min]	Neostigmin	63,884	62,879	64,890	2,714	4,249	7,36809
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	17,449	17,163	17,735	0,771	4,420	0,59486
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	4,902	4,765	5,039	0,369	7,520	0,13590
Fläche [AU $\cdot$ min]	Acetanilid	23,886	23,476	24,296	1,086	1,180	1,17983
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	4,891	4,775	5,008	0,310	6,334	0,09600
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,885	1,704	2,067	0,490	25,969	0,23970
t <sub>Mig</sub> [min]	N-Butyl-Scopolam	3,914	3,811	4,018	0,280	7,142	0,07816
Fläche [AU $\cdot$ min]	N-Butyl-Scopolam	17,249	16,941	17,557	0,832	4,823	0,69202
korr. Fläche [AU]	N-Butyl-Scopolam	4,419	4,332	4,505	0,234	5,286	0,05455

### 9.4.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00

BR-LAC-060603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,98	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	8,98	10,0	6,643	6,102	0,825
Neostigmin	50,53	10,0	16,666	15,308	4,641
$\beta$ -Lactoglobulin	28,38	10,0	0,311	0,285	5,214

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	5,98	676,50	51,69	4,970	0,290

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	10	12	30	20	40	25	73
P 1 Protein 1	30	12	30	20	40	25	73

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	3,073	3,059	3,088	0,023	0,755	0,00054
	P	Neostigmin	4,211	4,048	4,374	0,455	10,813	0,20731
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	59,475	58,812	60,139	1,070	1,800	1,14566
	P	Neostigmin	73,618	71,604	75,632	5,628	7,644	31,66986
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	19,354	19,084	19,624	0,436	2,251	0,18980
	P	Neostigmin	17,557	17,272	17,841	0,794	4,521	0,63005
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	4,883	4,849	4,917	0,055	1,123	0,00301
	P	Acetanilid	8,686	8,106	9,265	1,620	18,649	2,62396
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	26,876	24,769	28,982	3,399	12,646	11,55189
	P	Acetanilid	41,433	39,563	43,303	5,226	12,612	27,30766
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	5,503	5,080	5,926	0,682	12,400	0,46555
	P	Acetanilid	4,849	4,662	5,037	0,524	10,811	0,27485
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,356	3,323	3,390	0,054	1,616	0,00294
	P	Acetanilid	1,326	1,080	1,573	0,688	51,892	0,47364
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	5,392	5,183	5,600	0,475	8,816	0,22592
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	40,368	35,203	45,533	11,785	29,194	138,88813
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	7,697	6,568	8,826	2,576	33,474	6,63794

### 9.4.3 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

BR-LAC-260503	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	8,90	10,0	6,584	6,048	0,818
Neostigmin	49,44	10,0	16,306	14,978	4,541
$\beta$ -Lactoglobulin	30,44	10,0	0,333	0,306	5,592

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,51	570,35	148,36	4,191	0,834

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

		Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	$p_{\text{add}}$ [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1	Kontrolle	10	12	30	20	40	20.00	86
P	Protein	30	12	30	20	40	20.00	86

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	3,989	3,960	4,019	0,047	1,178	0,00221
	P	Neostigmin	4,284	4,211	4,357	0,204	4,764	0,04166
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	73,960	71,421	76,499	4,097	5,539	16,78276
	P	Neostigmin	69,346	66,931	71,760	6,748	9,732	45,54200
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	18,548	17,818	19,279	1,179	6,354	1,38891
	P	Neostigmin	16,220	15,611	16,829	1,701	10,485	2,89231
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	7,298	7,179	7,418	0,193	2,643	0,03721
	P	Acetanilid	8,247	8,006	8,488	0,673	8,165	0,45344
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	31,638	31,064	32,212	0,926	2,927	0,85784
	P	Acetanilid	36,395	34,676	38,114	4,804	13,199	23,07571
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	4,338	4,228	4,448	0,177	4,092	0,03151
	P	Acetanilid	4,442	4,204	4,680	0,666	15,000	0,44394
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	1,731	1,677	1,785	0,087	5,006	0,00751
	P	Acetanilid	1,370	1,284	1,455	0,240	17,489	0,05737
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	14,886	13,686	16,086	3,123	20,979	9,75239
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	75,752	64,569	86,935	29,094	38,406	846,44092
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	5,622	4,457	6,786	3,030	53,907	9,18344

9.4.4  $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

BR-LAC-110603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,00	10,0	6,658	6,116	0,827
Neostigmin	50,52	10,0	16,662	15,305	4,641
$\beta$ -Lactoglobulin	16,61	10,0	0,182	0,167	3,051

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	569,12	145,32	4,182	0,816

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

Läufe		t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]	
K1	Kontrolle 1	10	20	30	20	40	30.00	84
P 1	Protein 1	99	20	30	20	40	30.00	84

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	3,989	3,988	3,991	0,047	1,178	0,00221
	P 1	Neostigmin	3,900	3,800	3,999	0,711	18,224	0,50514
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	73,960	63,558	84,362	4,097	5,539	16,78276
	P 1	Neostigmin	70,686	-14,023	155,395	20,737	29,337	430,03047
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	18,548	17,687	19,409	1,179	6,354	1,38891
	P 1	Neostigmin	18,474	13,921	23,028	4,808	26,025	23,11573
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,495	4,493	4,497	0,061	1,348	0,00367
	P 1	Acetanilid	7,694	6,104	9,283	2,826	36,737	7,98859
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	24,294	23,146	25,443	1,361	5,604	1,85325
	P 1	Acetanilid	27,941	5,616	50,266	10,592	37,908	112,18562
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	5,405	5,350	5,461	0,300	5,542	0,08974
	P 1	Acetanilid	3,963	3,433	4,494	1,633	41,202	2,66677
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,781	3,778	3,784	0,072	1,896	0,00514
	P 1	Acetanilid	1,954	1,690	2,218	1,146	58,633	1,31290
t <sub>Mig</sub> [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	7,698	6,904	8,492	1,657	21,529	2,747
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	75,656	3,722	147,589	15,777	20,854	248,92076
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	10,115	8,978	11,252	1,984	19,610	3,93447

9.4.5  $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00

BR-LAC-02/030603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,99	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,00	10,0	6,658	6,116	0,827
Neostigmin	50,52	10,0	16,662	15,305	4,641
$\beta$ -Lactoglobulin	16,61	10,0	0,182	0,167	3,051

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	6,99	424,97	338,30	3,123	1,901

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

		Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	$p_{add}$ [mbar]	t [min]	I [ $\mu$ A]
K1	Kontrolle	10	12	30	20	40	25.00	104
P1	Protein	9	12	30	20	40	20.00	104
K2	Kontrolle	10	12	30	20	40	25.00	104
P2	Protein	30	12	30	20	40	20.00	104

06.02.03		Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{Mig}$	[min]	K1 Neostigmin	3,059	3,017	3,100	0,064	2,088	0,00408
		P 1 Neostigmin	3,061	3,045	3,076	0,024	0,783	0,00057
Fläche	[AU·min]	K1 Neostigmin	64,237	62,812	65,663	2,182	3,397	4,76287
		P 1 Neostigmin	62,505	61,890	63,120	0,941	1,506	0,88590
korr. Fläche	[AU]	K1 Neostigmin	21,001	20,689	21,313	0,477	2,272	0,22766
		P 1 Neostigmin	20,426	20,133	20,718	0,447	2,189	0,19986
$t_{Mig}$	[min]	K1 Acetanilid	4,732	4,611	4,853	0,185	3,917	0,03436
		P 1 Acetanilid	4,815	4,785	4,846	0,047	0,973	0,00220
Fläche	[AU·min]	K1 Acetanilid	34,668	22,889	46,447	18,030	52,007	325,06990
		P 1 Acetanilid	39,318	20,609	58,027	28,637	72,833	820,05400
korr. Fläche	[AU]	K1 Acetanilid	7,368	4,856	9,881	3,845	52,183	14,78446
		P 1 Acetanilid	8,181	4,259	12,103	6,003	73,384	36,04063
EOF	[ $10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	K1 Acetanilid	3,168	2,429	3,907	1,131	35,711	1,27980
		P 1 Acetanilid	3,425	3,394	3,457	0,048	1,405	0,00231
$t_{Mig}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,091	7,023	7,158	0,103	1,456	0,01066
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	72,293	71,359	73,227	1,429	1,977	2,04319
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	10,199	10,001	10,397	0,303	2,976	0,09211

06.03.03		Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{Mig}$	[min]	K1 Neostigmin	4,200	1,354	7,046	4,592	109,334	21,08337
		P 1 Neostigmin	2,996	2,878	3,114	0,269	8,982	0,07241
Fläche	[AU·min]	K1 Neostigmin	112,170	2,684	221,656	176,648	157,482	31204,6114
		P 1 Neostigmin	46,787	43,065	50,509	8,493	18,152	72,12584
korr. Fläche	[AU]	K1 Neostigmin	22,019	19,041	24,996	4,804	21,818	23,07944
		P 1 Neostigmin	15,951	14,204	17,699	3,988	25,000	15,90362
$t_{Mig}$	[min]	K1 Acetanilid	5,639	2,666	8,612	4,797	85,057	23,00791
		P 1 Acetanilid	4,801	4,503	5,100	0,681	14,186	0,46390
Fläche	[AU·min]	K1 Acetanilid	53,678	7,303	100,053	74,823	139,392	5598,47040
		P 1 Acetanilid	22,072	20,064	24,080	4,582	20,758	20,99239
korr. Fläche	[AU]	K1 Acetanilid	7,932	6,589	9,274	2,166	27,307	4,69104
		P 1 Acetanilid	4,784	4,149	5,419	1,449	30,286	2,09960
EOF	[ $10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	K1 Acetanilid	3,811	2,853	4,769	1,466	38,473	2,14993
		P 1 Acetanilid	3,530	3,233	3,826	0,677	19,176	0,45818
$t_{Mig}$	[min]	$\beta$ -Lactoglobulin	7,143	6,463	7,823	1,552	21,729	2,40913
Fläche	[AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin	55,640	50,176	61,105	12,468	22,409	155,46208
korr. Fläche	[AU]	$\beta$ -Lactoglobulin	8,362	7,090	9,634	2,902	34,712	8,42448

### 9.4.6 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

BR-LAC-170603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,46	10,0	6,999	16,071	2,172
Neostigmin	51,69	10,0	17,048	39,149	11,870
$\beta$ -Lactoglobulin	14,94	5,0	0,327	0,751	13,723
SDS	573,12	10,0	198,738	456,377	131,610

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	569,12	145,32	4,182	0,816

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
75471	50	375	60	48

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

		Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	$U$ [kV]	$p_{\text{add}}$ [mbar]	$t$ [min]	$I$ [ $\mu\text{A}$ ]
K	Kontrolle	15	12	30	20	40	30.00	83
P	Protein	10	50	30	20	40	30.00	83
SDS	SDS	40	12	30	20	40	30.00	83

Bei den Läufen mit SDS-Puffer wird 4 min mit der Tensid-Lösung gespült, anschließend mit Phosphat-Puffer nachgespült und anschließend die Probe injiziert.

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K	Neostigmin	3,086	3,077	3,096	0,138	4,474	0,01907
	P	Neostigmin	3,252	3,245	3,258	0,099	3,033	0,00972
	SDS	Neostigmin	4,514	4,466	4,562	0,374	8,275	0,14000
Fläche [AU·min]	K	Neostigmin	64,518	62,402	66,634	2,045	3,169	4,18138
	P	Neostigmin	36,677	30,030	43,325	3,275	8,929	10,72503
	SDS	Neostigmin	21,346	-22,503	65,195	11,250	52,702	126,55800
korr. Fläche [AU]	K	Neostigmin	20,969	19,773	22,164	1,537	7,330	2,36211
	P	Neostigmin	8,573	7,961	9,184	0,993	11,588	0,98690
	SDS	Neostigmin	4,834	1,724	7,944	2,996	61,981	8,97600
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K	Acetanilid	4,755	4,717	4,793	0,275	5,779	0,07550
	P	Acetanilid	5,218	5,183	5,253	0,239	4,573	0,05694
	SDS	Acetanilid	8,569	7,907	9,230	1,382	16,124	1,90900
Fläche [AU·min]	K	Acetanilid	28,661	28,227	29,095	0,926	3,232	0,85784
	P	Acetanilid	10,034	7,849	12,220	1,878	18,715	3,52683
	SDS	Acetanilid	6,041	-11,973	24,054	7,210	119,361	51,99100
korr. Fläche [AU]	K	Acetanilid	6,056	5,919	6,192	0,519	8,570	0,26931
	P	Acetanilid	1,185	1,131	1,239	0,296	24,944	0,08739
	SDS	Acetanilid	0,785	0,405	1,166	1,048	133,477	1,09900
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K	Acetanilid	3,504	3,462	3,545	0,285	8,139	0,08132
	P	Acetanilid	3,049	3,021	3,076	0,211	6,927	0,04460
	SDS	Acetanilid	1,310	1,241	1,379	0,447	34,083	0,19900
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	7,172	6,869	7,474	0,488	6,802	0,23798
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	171,229	164,119	178,340	11,472	6,700	131,61168
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	24,061	22,128	25,994	3,119	12,965	9,73056



## 9.5 $\beta$ -Lactoglobulin – beschichtete Kapillaren 2

### 9.5.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,50

PM-LAC-210104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Neostigmin	48,23	10,0	17,675	15,711	4,764
Nicotinsäure	15,00	10,0	13,539	12,035	1,482
$\beta$ -Lactoglobulin	15,03	5,00	0,183	0,162	2,969

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 200ml		CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa
soll	5,50	41,17	348,27	0,755	4,245
ist	5,50	54,00	238,72	0,948	2,910

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0 ml

ist: 90,13 mg/10,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle	30	12	30	20	40	8.00 67
P Protein	30	12	30	20	40	8.00 67
K2 Kontrolle 2						Kapillare gebrochen

Substanz	$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1 Neostigmin 2,924	2,913	2,936	0,031	1,075	0,00099
	P 1 Neostigmin 2,958	2,955	2,962	0,011	0,364	0,00012
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1 Neostigmin 285,928	283,137	288,719	7,801	2,728	60,84988
	P 1 Neostigmin 328,852	325,488	332,215	9,398	2,858	88,32575
korr. Fläche [AU]	K1 Neostigmin 97,794	96,692	98,897	3,081	3,151	9,49431
	P 1 Neostigmin 111,163	109,972	112,354	3,328	2,994	11,07865
t <sub>Mig</sub> [min]	K1 Nicotinsäure 5,314	5,292	5,337	0,062	1,175	0,00390
	P 1 Nicotinsäure 5,289	5,282	5,296	0,021	0,388	0,00042
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1 Nicotinsäure 279,827	276,658	282,997	8,856	3,165	78,43392
	P 1 Nicotinsäure 314,927	311,190	318,665	10,445	3,317	109,10020
korr. Fläche [AU]	K1 Nicotinsäure 52,665	52,002	53,328	1,852	3,517	3,43029
	P 1 Nicotinsäure 59,547	58,821	60,273	2,028	3,406	4,11284
t <sub>Mig</sub> [min]	$\beta$ -Lactoglobulin 4,208	4,202	4,214	0,017	0,393	0,00027
Fläche [AU $\cdot$ min]	$\beta$ -Lactoglobulin 139,142	135,460	142,823	10,288	7,394	105,84094
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin 33,071	32,189	33,953	2,466	7,456	6,08007

### 9.5.2 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,25

PM-LAC-140104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,25	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,55	10,0	7,850	6,978	0,943
Neostigmin	48,23	10,0	17,675	15,711	4,764
$\beta$ -Lactoglobulin	15,10	5,00	0,184	0,163	2,983

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 200ml		CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa
soll	5,50	41,17	348,27	0,755	4,245
ist	5,25	535,00	238,72	0,948	2,910

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml  
ist: 90,00 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

Läufe		t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]	
K1	Kontrolle	30	12	30	20	40	5.00	68
P	Protein	30	12	30	20	40	10.00	68
K2	Kontrolle	20	12	30	20	40	8.00	68

Substanz				$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,936	2,932	2,940	0,012	0,410	0,00014	
	P	Neostigmin	2,898	2,873	2,922	0,067	2,306	0,00447	
	K2	Neostigmin	3,037	3,025	3,050	0,029	0,943	0,00082	
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	273,166	271,201	275,131	5,492	2,010	30,15844	
	P	Neostigmin	267,554	265,238	269,870	6,364	2,378	40,49436	
	K2	Neostigmin	266,312	264,913	267,711	3,193	1,199	10,19410	
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	93,044	92,352	93,736	1,933	2,078	3,73649	
	P	Neostigmin	92,357	91,493	93,222	2,375	2,571	5,63977	
	K2	Neostigmin	87,687	87,090	88,284	1,362	1,554	1,85606	
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	4,520	4,512	4,527	0,020	0,447	0,00041	
	P	Acetanilid	4,332	4,293	4,371	0,106	2,453	0,01129	
	K2	Acetanilid	4,660	4,642	4,678	0,041	0,882	0,00169	
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	150,172	148,632	151,712	4,303	2,866	18,51741	
	P	Acetanilid	181,901	178,556	185,246	9,192	5,053	84,48582	
	K2	Acetanilid	144,649	143,404	145,894	2,841	1,964	8,07201	
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	33,227	32,881	33,572	0,964	2,903	0,93014	
	P	Acetanilid	42,004	41,224	42,784	2,143	5,102	4,59206	
	K2	Acetanilid	31,045	30,712	31,378	0,759	2,446	0,57668	
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	3,751	3,742	3,759	0,024	0,630	0,00056	
	P	Acetanilid	3,984	3,934	4,034	0,137	3,434	0,01872	
	K2	Acetanilid	3,591	3,571	3,611	0,046	1,269	0,00208	
$t_{\text{Mig}}$ [min]	β-Lactoglobulin		3,770	3,736	3,804	0,093	2,468	0,00866	
Fläche [AU·min]	β-Lactoglobulin		102,782	97,794	107,769	13,703	13,332	187,76179	
korr. Fläche [AU]	β-Lactoglobulin		27,240	25,992	28,487	3,427	12,582	11,74624	

### 9.5.3 β-Lactoglobulin pH 6,00

PM-LAC-201103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,14	10,0	6,762	6,011	0,812
Neostigmin	49,64	10,0	16,372	14,554	4,413
β-Lactoglobulin	15,24	10,0	0,167	0,148	2,709

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	641,58	52,24	4,714	0,293

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0 ml  
ist: 90,06 mg/10,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

		Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	$p_{\text{add}}$ [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1	Kontrolle	30	12	30	20	40	7.00	76
P	Protein	30	12	30	20	40	15.00	76
K2	Kontrolle	15	12	30	20	40	7.00	76

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,202	2,193	2,211	0,026	1,200	0,00070
	P	Neostigmin	2,196	2,127	2,266	0,191	8,712	0,03661
	K2	Neostigmin	2,142	2,109	2,175	0,066	3,074	0,00434
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	508,966	505,874	512,057	8,638	1,697	74,62005
	P	Neostigmin	240,748	224,054	257,442	45,868	19,052	2103,87958
	K2	Neostigmin	404,460	395,406	413,514	17,891	4,423	320,09578
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	231,166	229,505	232,827	4,642	2,008	21,54501
	P	Neostigmin	109,320	103,262	115,378	16,644	15,225	277,02804
	K2	Neostigmin	189,145	182,610	195,680	12,914	6,828	166,77674
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	3,087	2,854	3,319	0,628	20,344	0,39429
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	89,381	69,508	109,255	53,654	60,029	2878,79344
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	27,093	22,719	31,467	11,809	43,586	139,44746

### 9.5.4 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,08

PM-LAC-051203	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,08	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,55	10,0	7,065	6,280	0,849
Neostigmin	48,23	10,0	15,907	14,140	4,287
$\beta$ -Lactoglobulin	15,40	5,00	0,168	0,150	2,738

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,08	642,47	62,31	4,721	0,350

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 45,00 mg/5,00 ml  
ist: 45,65 mg/5,00 ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

		Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	$p_{\text{add}}$ [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1	Kontrolle	30	12	30	20	30	5.00	81
P	Protein	30	12	30	20	30	15.00	81
K2	Kontrolle	20	12	30	20	30	15.00	81

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,637	2,609	2,665	0,077	2,905	0,00587
	P	Neostigmin	2,397	2,345	2,449	0,146	6,095	0,02134
	K2	Neostigmin	2,528	2,505	2,551	0,053	2,097	0,00281
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	305,669	299,970	311,368	15,659	5,123	245,18986
	P	Neostigmin	277,821	270,246	285,396	21,168	7,619	448,10492
	K2	Neostigmin	304,548	299,399	309,698	11,750	3,858	138,06723
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	115,891	114,341	117,442	4,261	3,676	18,15365
	P	Neostigmin	115,839	114,685	116,993	3,225	2,784	10,40134
	K2	Neostigmin	120,446	119,361	121,531	2,476	2,056	6,13174
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	4,292	4,220	4,364	0,198	4,618	0,03929
	P	Acetanilid	3,615	3,483	3,747	0,344	9,514	0,11827
	K2	Acetanilid	4,179	4,104	4,255	0,172	4,127	0,02975
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	178,605	175,018	182,191	9,854	5,517	97,09371
	P	Acetanilid	154,594	147,440	161,748	18,612	12,039	346,40948
	K2	Acetanilid	209,234	201,924	216,544	16,680	7,972	278,21501

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	41,630	41,195	42,065	1,196	2,873	1,43008
	P	Acetanilid	42,687	42,123	43,251	1,467	3,437	2,15313
	K2	Acetanilid	50,139	48,078	52,199	4,702	9,378	22,10670
EOF $[10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	4,623	4,508	4,738	0,316	6,830	0,09969
	P	Acetanilid	5,748	5,508	5,988	0,623	10,845	0,38862
	K2	Acetanilid	4,774	4,664	4,884	0,250	5,244	0,06268
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	4,399	4,232	4,565	0,434	9,856	0,18793
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	154,886	145,074	164,697	25,526	16,480	651,56732
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	35,098	33,823	36,373	3,317	9,451	11,00197

### 9.5.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

PM-LAC-041203	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,52	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,55	10,0	7,850	6,978	0,943
Neostigmin	48,23	10,0	17,675	15,711	4,764
$\beta$ -Lactoglobulin	30,47	10,0	0,185	0,165	3,009

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,52	572,46	151,54	4,206	0,851

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0 ml  
ist: 90,00 mg/10,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

Läufe		$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	$p_{\text{add}}$ [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]	
K1	Kontrolle	30	12	30	20	30	5.00	84
P	Protein	30	12	30	20	30	12.00	84
K2	Kontrolle	20	12	30	20	30	12.00	84

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,499	2,488	2,510	0,031	1,256	0,00098
	P	Neostigmin	2,502	2,497	2,507	0,015	0,585	0,00021
	K2	Neostigmin	2,488	2,475	2,502	0,030	1,217	0,00092
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	294,394	290,565	298,223	10,701	3,635	114,51340
	P	Neostigmin	273,985	271,679	276,291	6,445	2,352	41,53583
	K2	Neostigmin	301,540	297,503	305,577	9,211	3,055	84,84854
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	117,806	116,281	119,331	4,262	3,618	18,16447
	P	Neostigmin	109,502	108,527	110,477	2,724	2,488	7,42186
	K2	Neostigmin	121,163	120,104	122,222	2,416	1,994	5,83893
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	3,952	3,935	3,970	0,049	1,237	0,00239
	P	Acetanilid	3,940	3,932	3,948	0,023	0,588	0,00054
	K2	Acetanilid	3,947	3,923	3,970	0,054	1,368	0,00291
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	169,766	167,198	172,334	7,177	4,227	51,50579
	P	Acetanilid	156,335	154,317	158,352	5,638	3,606	31,78483
	K2	Acetanilid	176,586	174,405	178,767	4,976	2,818	24,75945
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	42,964	42,276	43,652	1,922	4,474	3,69453
	P	Acetanilid	39,682	39,147	40,217	1,495	3,768	2,23538
	K2	Acetanilid	44,739	44,326	45,152	0,942	2,106	0,88787
EOF $[10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	4,717	4,689	4,745	0,079	1,668	0,00619
	P	Acetanilid	4,735	4,722	4,749	0,037	0,787	0,00139
	K2	Acetanilid	4,725	4,688	4,763	0,086	1,817	0,00737
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	5,304	5,289	5,318	0,040	0,761	0,00163
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	228,814	220,332	237,296	23,306	10,185	543,16182
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	43,150	41,532	44,769	4,448	10,308	19,78234

9.5.6  $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

PM-LAC-191103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,14	10,0	6,762	6,011	0,812
Neostigmin	49,64	10,0	16,372	14,554	4,413
$\beta$ -Lactoglobulin	30,24	10,0	0,165	0,147	2,688

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	570,06	145,15	4,189	0,815

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0 ml  
 ist: 226,74 mg/25,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

Läufe		t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]	
K1	Kontrolle	30	12	30	20	40	10.00	89
P	Protein	30	12	30	20	40	30.00	98
K2	Kontrolle	15	12	30	20	40	5.00	98

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,154	2,147	2,161	0,021	0,961	0,00043
	P	Neostigmin	2,109	2,035	2,183	0,186	8,799	0,03443
	K2	Neostigmin	1,730	1,692	1,769	0,077	4,425	0,00586
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	188,132	181,923	194,340	17,350	9,223	301,03788
	P	Neostigmin	404,315	224,695	583,935	448,965	111,043	201569,266
	K2	Neostigmin	147,499	137,668	157,331	19,428	13,172	377,45430
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	87,386	84,365	90,408	8,444	9,663	71,30183
	P	Neostigmin	186,305	108,490	264,121	194,502	104,399	37830,915
	K2	Neostigmin	85,025	80,940	89,110	8,073	9,494	65,16526
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,168	3,158	3,178	0,028	0,880	0,00078
	P	Acetanilid	2,685	2,670	2,700	0,023	0,862	0,00054
	K2	Acetanilid	2,336	2,247	2,424	0,175	7,484	0,03056
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	104,275	101,844	106,706	6,793	6,515	46,14580
	P	Acetanilid	104,806	80,596	129,016	37,057	35,358	1373,23500
	K2	Acetanilid	77,811	71,139	84,482	13,184	16,943	173,81084
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	32,931	32,121	33,740	2,262	6,870	5,11752
	P	Acetanilid	39,092	29,989	48,195	13,934	35,643	194,14566
	K2	Acetanilid	33,161	31,381	34,941	3,518	10,607	12,37341
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	6,271	6,246	6,295	0,068	1,079	0,00458
	P	Acetanilid	7,679	7,627	7,731	0,080	1,038	0,00635
	K2	Acetanilid	9,107	8,753	9,462	0,700	7,686	0,49003
t <sub>Mig</sub> [min]	$\beta$ -Lactoglobulin		-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	$\beta$ -Lactoglobulin		-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	$\beta$ -Lactoglobulin		-	-	-	-	-	-

9.5.7  $\beta$ -Lactoglobulin pH 7,00

PM-LAC-181103	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,14	10,0	6,762	6,011	0,812
Neostigmin	49,64	10,0	16,372	14,554	4,413
$\beta$ -Lactoglobulin	30,24	10,0	0,165	0,147	2,688

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	7,00	421,80	341,20	3,099	1,917

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0 ml

ist: 226,53 mg/25,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [µm]	O.D. [µm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>add</sub> [mbar]	t [min]	I [µA]
K1	Kontrolle	30	12	30	20	40	4.00	97
P	Protein	30	12	30	20	40	20.00	97
K2	Kontrolle	15	12	30	20	40	20.00	97

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,857	1,852	1,862	0,014	0,773	0,00021
	P	Neostigmin	1,369	1,320	1,417	0,133	9,738	0,01776
	K2	Neostigmin	1,702	1,675	1,729	0,053	3,134	0,00285
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	367,068	364,457	369,679	7,296	1,988	53,23845
	P	Neostigmin	145,401	139,613	151,190	15,904	10,938	252,95022
	K2	Neostigmin	350,598	339,089	362,107	22,742	6,487	517,19018
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	197,656	196,036	199,277	4,530	2,292	20,51733
	P	Neostigmin	106,213	104,632	107,794	4,343	4,089	18,85991
	K2	Neostigmin	205,794	202,111	209,477	7,278	3,537	52,96877
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,696	2,689	2,703	0,020	0,744	0,00040
	P	Acetanilid	1,745	1,659	1,831	0,236	13,508	0,05556
	K2	Acetanilid	2,358	2,304	2,411	0,106	4,497	0,01124
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	99,230	98,291	100,170	2,626	2,646	6,89592
	P	Acetanilid	67,647	63,689	71,606	10,876	16,077	118,28097
	K2	Acetanilid	92,436	88,915	95,958	6,959	7,528	48,42715
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	36,806	36,432	37,181	1,046	2,842	1,09410
	P	Acetanilid	38,692	38,128	39,256	1,549	4,004	2,39956
	K2	Acetanilid	39,165	38,440	39,890	1,433	3,658	2,05274
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	7,639	7,615	7,664	0,068	0,896	0,00469
	P	Acetanilid	12,849	12,290	13,408	1,536	11,954	2,35930
	K2	Acetanilid	8,980	8,735	9,226	0,485	5,403	0,23546
t <sub>Mig</sub> [min]		β-Lactoglobulin	2,078	1,947	2,209	0,361	17,377	0,13039
Fläche [AU·min]		β-Lactoglobulin	75,941	71,116	80,767	13,257	17,457	175,75609
korr. Fläche [AU]		β-Lactoglobulin	36,572	35,913	37,230	1,810	4,950	3,27652
t <sub>Mig</sub> [min]		β-Lactoglobulin	8,212	7,741	8,684	0,991	12,067	0,98205
Fläche [AU·min]		β-Lactoglobulin	224,492	202,035	246,949	47,242	21,044	2231,78818
korr. Fläche [AU]		β-Lactoglobulin	28,233	24,287	32,179	8,300	29,400	68,89774

## 9.6 $\beta$ -Lactoglobulin

### 9.6.1 $\beta$ -Lactoglobulin pH 5,00

<b>b-LAC-080505</b>	<b>Einwaage</b>	<b>V<sub>int. Sta.</sub></b>	<b>C<sub>Probe</sub></b>	<b>n<sub>Inject</sub></b>	<b>m<sub>Inject</sub></b>
<b>pH 5,00</b>	<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[<math>\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[ng]</b>
Acetanilid	8,80	10	6,510	5,980	0,808
Neostigmin	44,59	10,0	14,707	13,509	4,096
$\beta$ -Lactoglobulin	14,41	5,00	0,315	0,290	5,295

<b>Acetat-Puffer</b>	<b>pH</b>	<b>V [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>m [mg]</b>	<b>n [mmol]</b>	<b>n [mmol]</b>
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{CH}_3\text{COOH}$	$\text{CH}_3\text{COONa}$	$\text{CH}_3\text{COOH}$	$\text{CH}_3\text{COONa}$
soll	5,00	98,14	262,55	1,800	3,200
ist	5,01	100	263,46	1,755	3,211

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot\text{ml}^{-1}$  soll: 450,00 mg/50,0ml

ist: 449,29 mg/50,0ml

<b>Kapillarcharge</b>	<b>I.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>O.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>L<sub>ges</sub> [cm]</b>	<b>L<sub>Det</sub> [cm]</b>
DRR 05A	51	360	60	48

	<b>Läufe</b>	<b>t<sub>Inj</sub> [s]</b>	<b>p<sub>Inj</sub> [mbar]</b>	<b>U [kV]</b>	<b>t [min]</b>	<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	7.00	48
P Protein	30	12	30	25	30.00	48
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	20.00	48

<b>Substanz</b>			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	<b>RSD %</b>	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,931	2,917	2,946	0,040	1,356	0,00158
	P	Neostigmin	4,030	3,840	4,221	0,532	13,190	0,28262
	K2	Neostigmin	4,389	4,379	4,399	0,028	0,645	0,00080
Fläche [AU $\cdot\text{min}$ ]	K1	Neostigmin	73,418	73,083	73,754	0,937	1,276	0,87731
	P	Neostigmin	95,650	90,933	100,368	13,184	13,784	173,82216
	K2	Neostigmin	111,524	110,018	113,030	4,208	3,774	17,71109
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	25,050	24,891	25,209	0,445	1,776	0,19786
	P	Neostigmin	23,714	23,614	23,814	0,280	1,180	0,07837
	K2	Neostigmin	25,415	25,037	25,793	1,057	4,159	1,11718
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,983	4,955	5,012	0,080	1,611	0,00644
	P	Acetanilid	10,186	9,101	11,271	3,032	29,762	9,19034
	K2	Acetanilid	11,868	11,790	11,946	0,219	1,846	0,04799
Fläche [AU $\cdot\text{min}$ ]	K1	Acetanilid	51,375	51,076	51,674	0,835	1,625	0,69662
	P	Acetanilid	96,468	84,790	108,147	32,637	33,831	1065,14400
	K2	Acetanilid	119,335	117,867	120,802	4,101	3,437	16,82089
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	10,312	10,232	10,391	0,222	2,150	0,04914
	P	Acetanilid	9,339	9,162	9,516	0,495	5,301	0,24513
	K2	Acetanilid	10,062	9,895	10,228	0,466	4,636	0,21755
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,854	3,832	3,876	0,062	1,614	0,00387
	P	Acetanilid	2,096	1,827	2,364	0,751	35,834	0,56396
		Acetanilid	1,618	1,608	1,629	0,029	1,822	0,00087
t <sub>Mig</sub> [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot\text{min}$ ]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	-	-	-	-	-	-

9.6.2  $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,00

<b>b-LAC-161204</b>	<b>Einwaage</b>	<b>V<sub>int. Sta.</sub></b>	<b>C Probe</b>	<b>n<sub>Inject</sub></b>	<b>m<sub>Inject</sub></b>
<b>pH 6,00</b>	<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[<math>\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[ng]</b>
Acetanilid	8,97	10,0	6,636	6,096	0,824
Neostigmin	49,58	10,0	16,352	15,020	4,554
$\beta$ -Lactoglobulin	14,31	5,00	0,313	0,288	5,258

<b>Phosphat-Puffer</b>	<b>pH</b>	<b>m [mg]</b> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>m [mg]</b> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	<b>n [mmol]</b> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	<b>n [mmol]</b> HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	641,67	51,93	4,715	0,292

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0ml  
ist: 225,03 mg/25,0ml

<b>Kapillarcharge</b>	<b>I.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>O.D. [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>L<sub>ges</sub> [cm]</b>	<b>L<sub>Det</sub> [cm]</b>
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	<b>Läufe</b>	<b>t<sub>Inj</sub> [s]</b>	<b>p<sub>Inj</sub> [mbar]</b>	<b>U [kV]</b>	<b>t [min]</b>	<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	5.00	46
P Protein	30	12	30	25	15.00	46
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	10.00	46

<b>Substanz</b>			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	<b>RSD %</b>	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,664	2,583	2,744	0,225	8,431	0,05044
	P	Neostigmin	4,153	4,060	4,245	0,259	6,243	0,06722
	K2	Neostigmin	3,617	3,499	3,735	0,330	9,121	0,10885
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	77,312	74,647	79,977	7,448	9,633	55,46968
	P	Neostigmin	134,151	129,960	138,343	11,714	8,732	137,20953
	K2	Neostigmin	102,017	97,755	106,279	11,910	11,675	141,85239
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	28,999	28,789	29,209	0,587	2,024	0,34448
	P	Neostigmin	32,270	31,833	32,707	1,221	3,785	1,49203
	K2	Neostigmin	28,142	27,840	28,443	0,843	2,997	0,71111
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,231	4,059	4,404	0,383	9,054	0,14677
	P	Acetanilid	11,216	9,799	12,632	1,770	15,783	3,13379
	K2	Acetanilid	7,410	6,868	7,951	1,235	16,670	1,52572
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	41,318	39,591	43,044	3,840	9,293	14,74434
	P	Acetanilid	157,382	131,711	183,052	32,082	20,385	1029,23192
	K2	Acetanilid	71,166	64,711	77,622	14,730	20,698	216,96371
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	9,765	9,655	9,875	0,244	2,501	0,05964
	P	Acetanilid	13,972	13,126	14,817	1,057	7,567	1,11760
	K2	Acetanilid	9,552	9,336	9,768	0,493	5,158	0,24271
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,572	4,391	4,752	0,401	8,782	0,16119
	P	Acetanilid	1,746	1,534	1,959	0,265	15,187	0,07035
		Acetanilid	2,660	2,468	2,852	0,438	16,476	0,19207
t <sub>Mig</sub> [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	5,760	5,351	6,170	1,125	19,532	1,26578
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	71,617	61,681	81,553	27,301	38,121	745,32936
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	13,193	10,947	15,439	6,172	46,779	38,08750

9.6.3  $\beta$ -Lactoglobulin pH 6,50

<b>b-LAC-170205</b>	<b>Einwaage</b>	<b>V<sub>int. Sta.</sub></b>	<b>C Probe</b>	<b>n<sub>Inject</sub></b>	<b>m<sub>Inject</sub></b>
<b>pH 6,50</b>	<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[<math>\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[ng]</b>
Acetanilid	4,90	5,00	7,250	6,660	0,900
Neostigmin	24,46	5,00	16,135	14,821	4,494
$\beta$ -Lactoglobulin	15,00	5,00	0,328	0,301	5,511





## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
XFZ 05A	50	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	62
P Protein	30	12	30	25	10.00	62
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	10.00	62

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,208	2,199	2,218	0,026	1,163	0,00066
	P	Neostigmin	2,247	2,236	2,259	0,032	1,422	0,00102
	K2	Neostigmin	2,263	2,253	2,273	0,028	1,242	0,00079
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	71,638	70,860	72,415	2,172	3,032	4,71683
	P	Neostigmin	66,517	65,716	67,318	2,238	3,365	5,00873
	K2	Neostigmin	67,075	66,348	67,802	2,033	3,031	4,13191
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	32,439	32,116	32,761	0,902	2,780	0,81322
	P	Neostigmin	29,608	29,202	30,013	1,133	3,828	1,28460
	K2	Neostigmin	29,649	29,273	30,026	1,052	3,547	1,10622
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	3,269	3,253	3,284	0,043	1,330	0,00189
	P	Acetanilid	3,290	3,276	3,304	0,039	1,197	0,00155
	K2	Acetanilid	3,293	3,278	3,308	0,042	1,266	0,00174
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	41,380	40,868	41,891	1,429	3,454	2,04316
	P	Acetanilid	37,482	37,000	37,963	1,345	3,588	1,80880
	K2	Acetanilid	37,484	37,071	37,897	1,154	3,079	1,33168
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	12,659	12,526	12,792	0,372	2,937	0,13827
	P	Acetanilid	11,395	11,234	11,556	0,450	3,946	0,20217
	K2	Acetanilid	11,385	11,243	11,528	0,397	3,491	0,15799
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	5,875	5,848	5,903	0,077	1,308	0,00590
	P	Acetanilid	5,837	5,811	5,862	0,071	1,212	0,00501
	K2	Acetanilid	5,831	5,805	5,858	0,075	1,290	0,00566
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	4,366	4,350	4,381	0,042	0,972	0,00180
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	109,386	107,409	111,362	5,523	5,050	30,50852
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	25,062	24,571	25,554	1,373	5,478	1,88504

### 9.6.5 $\beta$ -Lactoglobulin pH 8,00

b-LAC-160205	Einwaage	V int. Sta.	C Probe	n Inject	m Inject
pH 8,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,82	5,00	7,132	6,551	0,885
Neostigmin	25,73	5,00	16,972	15,590	4,727
$\beta$ -Lactoglobulin	14,86	5,00	0,325	0,299	5,460

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$		$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$
soll	8,00	94,96	765,76	0,70	4,30
ist	8,00	94,25	767,86	0,693	4,314

NaCl-Lsg 154 mmol  $\cdot \text{ml}^{-1}$  soll: 90,00 mg/10,0ml  
 ist: 90,14 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
XFZ 05A	50	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	81
P Protein	30	12	30	25	6.00	84
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	81

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,019	2,014	2,024	0,014	0,689	0,00019
	P	Neostigmin	2,058	2,045	2,071	0,036	1,761	0,00131
	K2	Neostigmin	2,110	2,106	2,114	0,012	0,549	0,00013
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	63,750	63,639	63,862	0,311	0,488	0,09683
	P	Neostigmin	67,734	67,574	67,893	0,446	0,658	0,19866
	K2	Neostigmin	62,874	62,704	63,043	0,473	0,752	0,22374
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	31,576	31,492	31,659	0,232	0,736	0,05400
	P	Neostigmin	32,929	32,663	33,196	0,745	2,263	0,55513
	K2	Neostigmin	29,800	29,692	29,908	0,302	1,012	0,09097
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	2,871	2,864	2,878	0,019	0,678	0,00038
	P	Acetanilid	2,902	2,886	2,917	0,043	1,472	0,00182
	K2	Acetanilid	2,970	2,966	2,974	0,011	0,370	0,00012
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	34,283	34,193	34,373	0,251	0,733	0,06323
	P	Acetanilid	31,378	31,276	31,480	0,285	0,907	0,08106
	K2	Acetanilid	33,545	33,443	33,646	0,283	0,844	0,08009
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	11,940	11,906	11,974	0,095	0,797	0,00906
	P	Acetanilid	10,816	10,743	10,889	0,204	1,884	0,04151
	K2	Acetanilid	11,295	11,256	11,335	0,111	0,986	0,01241
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	6,687	6,671	6,703	0,045	0,677	0,00205
	P	Acetanilid	6,618	6,583	6,653	0,098	1,475	0,00953
		Acetanilid	6,465	6,457	6,474	0,024	0,370	0,00057
t <sub>Mig</sub> [min]		β-Lactoglobulin	4,020	4,003	4,036	0,046	1,139	0,00210
Fläche [AU·min]		β-Lactoglobulin	74,250	73,326	75,173	2,582	3,477	6,66507
korr. Fläche [AU]		β-Lactoglobulin	18,479	18,194	18,764	0,796	4,309	0,63403

### 9.6.6 β-Lactoglobulin pH 9,20

b-LAC-101204	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,44	10,0	7,724	7,095	0,959
Neostigmin	50,88	10,0	16,781	15,414	4,674
β-Lactoglobulin	13,76	5,00	0,301	0,277	5,056

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup>		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	953,43	5,000	5,000
ist	9,20	0,00	9534,54	50,000	50,000

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0ml  
ist: 225,21 mg/25,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	39
P Protein	30	12	30	25	8.00	39
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	39

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,984	1,979	1,989	0,015	0,733	0,00021
	P	Neostigmin	2,080	2,062	2,098	0,050	2,383	0,00246
	K2	Neostigmin	2,142	2,138	2,145	0,010	0,485	0,00011
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	53,517	53,139	53,894	1,055	1,972	1,11387
	P	Neostigmin	54,120	53,979	54,261	0,394	0,728	0,15529
	K2	Neostigmin	52,208	52,091	52,325	0,327	0,626	0,10678
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	26,969	26,818	27,121	0,424	1,572	0,17977
	P	Neostigmin	26,034	25,817	26,251	0,606	2,328	0,36737
	K2	Neostigmin	24,380	24,304	24,455	0,211	0,865	0,04446

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

		Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	2,813	2,807	2,819	0,018	0,00031
	P	Acetanilid	2,955	2,929	2,981	0,072	0,00517
	K2	Acetanilid	3,042	3,038	3,046	0,010	0,00010
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	30,658	30,436	30,880	0,620	0,38467
	P	Acetanilid	30,573	30,470	30,676	0,287	0,08230
	K2	Acetanilid	30,118	30,026	30,210	0,257	0,06594
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	10,898	10,836	10,960	0,174	0,03040
	P	Acetanilid	10,350	10,276	10,425	0,207	0,04294
	K2	Acetanilid	9,901	9,865	9,938	0,102	0,01036
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	6,826	6,810	6,841	0,043	0,00183
	P	Acetanilid	6,501	6,444	6,559	0,161	0,02581
	P	Acetanilid	6,312	6,304	6,319	0,021	0,00043
$t_{\text{Mig}}$ [min]		$\beta$ -Lactoglobulin	4,281	4,242	4,319	0,108	0,01157
Fläche [AU·min]		$\beta$ -Lactoglobulin	78,851	78,552	79,150	0,835	0,69657
korr. Fläche [AU]		$\beta$ -Lactoglobulin	18,432	18,249	18,615	0,512	0,26189

## 9.7 Myoglobin – weiterführende Untersuchungen

### 9.7.1 Myoglobin pH 5,25

MYOA-220102	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,27	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,62	10,0	4,270	0,806	0,109
Neostigmin	98,54	10,0	19,500	3,681	1,116
Myoglobin	19,73	10,0	0,279	0,053	0,894

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	V [ml]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 0,2 l		(Ac) <sub>2</sub> O	NaOH (1M)	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
soll	5,00	942,69	15,26	4,805	15,195
ist	5,00	943,00	15,30	4,652	15,300

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
GBH 02C	46-50	353	62	49

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
Protein	20	9	10	22	15	47

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Neostigmin	3,645	3,519	3,770	0,286	7,838	0,08159
Fläche [AU $\cdot$ min]	Neostigmin	16,962	16,539	17,386	0,966	5,696	0,93334
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	4,684	4,470	4,897	0,486	10,382	0,23646
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	6,076	5,759	6,392	0,723	11,905	0,52314
Fläche [AU $\cdot$ min]	Acetanilid	4,196	4,036	4,355	0,364	8,669	0,13229
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	0,694	0,674	0,714	0,046	6,629	0,00212
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	3,838	3,644	4,032	0,443	11,541	0,19620
t <sub>Mig</sub> [min]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot$ min]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-

### 9.7.2 Myoglobin pH 5,25

MYOA-230102	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,27	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,62	10,0	4,270	0,806	0,109
Neostigmin	98,54	10,0	19,500	3,681	1,116
Myoglobin	19,73	10,0	0,279	0,053	0,894

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	V [ml]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 0,2 l		(Ac) <sub>2</sub> O	NaOH (1M)	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
soll	5,00	942,69	15,26	4,805	15,195
ist	5,00	943,00	15,30	4,652	15,300

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
GBH 02C	46-50	353	62	49

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
Protein	20	9	10	22	15	47

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]		Neostigmin	4,632	4,442	4,823	0,434	9,367	0,18830
Fläche [AU·min]		Neostigmin	20,428	19,439	21,418	2,258	11,052	5,09786
korr. Fläche [AU]		Neostigmin	4,405	4,331	4,479	0,169	3,847	0,02872
t <sub>Mig</sub> [min]		Acetanilid	9,709	8,871	10,546	1,911	19,687	3,65345
Fläche [AU·min]		Acetanilid	6,313	5,874	6,751	1,000	15,848	1,00078
korr. Fläche [AU]		Acetanilid	0,655	0,639	0,671	0,036	5,545	0,00132
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]		Acetanilid	2,453	2,258	2,648	0,445	18,153	0,19826
t <sub>Mig</sub> [min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-

### 9.7.3 Myoglobin pH 5,25

MYOA-240102	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,27	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
SDS	2883,80	50,00	2000,000	1400,948	404,005
SDS + 50% Isopropanol	2883,80	50,00	1000,000	700,474	202,003

Acetat-Puffer	pH	V [μl]	V [ml]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup> 0,2 l		(Ac) <sub>2</sub> O	NaOH (1M)	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
soll	5,00	942,69	15,26	4,805	15,195
ist	5,00	943,00	15,30	4,652	15,300

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
GBH 02C	46-50	353	62	49

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	3	30	10	5,00	20,0	20
K2 Kontrolle 2	4	30	10	15,00	20,0	70
K3 Kontrolle 3	8	30	10	15,00	20,0	36

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]		SDS 1	14,705	14,013	15,397	0,706	4,803	0,49872
Fläche [AU·min]		SDS 1	47,667	45,817	49,517	1,888	3,961	3,56450
korr. Fläche [AU]		SDS 1	3,251	2,977	3,525	0,279	8,594	0,07808
t <sub>Mig</sub> [min]		SDS 2 15kV	11,867	10,656	13,078	1,748	14,731	3,05606
Fläche [AU·min]		SDS 2 15kV	70,533	58,141	82,925	17,883	25,354	319,80179
korr. Fläche [AU]		SDS 2 15kV	6,173	4,597	7,749	2,274	36,842	5,17256
t <sub>Mig</sub> [min]		SDS 3 15kV	13,054	11,934	14,175	1,278	9,790	1,63335
Fläche [AU·min]		SDS 3 15kV	1,066	0,526	1,606	0,616	57,771	0,37952
korr. Fläche [AU]		SDS 3 15kV	14,401	7,036	21,766	8,402	58,345	70,60122

### 9.7.4 Myoglobin pH 5,00

MYOA-240602	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,90	10,0	4,394	0,918	0,124
Neostigmin	102,54	10,0	20,292	4,240	1,286
Myoglobin	19,65	10,0	0,278	0,058	0,986

Der Trennpuffer pH 5,00 (100 mmol l<sup>-1</sup>) wird hergestellt durch Mischen von 10,0 ml Essigsäure (1 mol·l<sup>-1</sup>) und 32,0 ml Natronlauge (0,20 mol·l<sup>-1</sup>). Durch Auffüllen auf 100,0 ml mit bidest. Wasser wird die endgültige Konzentration von 100 mmol·l<sup>-1</sup> eingestellt und vor Gebrauch steril filtriert.

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
RWI- 01A	46-50	353	56	44

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
Protein	20	9	10	30	20	140

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Neostigmin	4,205	3,703	4,706	0,723	17,205	0,52336
Fläche [AU·min]	Neostigmin	23,325	21,597	25,053	2,494	10,692	6,21998
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	5,611	5,247	5,974	0,525	9,355	0,27549
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	12,533	9,780	15,286	2,809	22,411	7,88941
Fläche [AU·min]	Acetanilid	13,390	8,942	17,838	4,539	33,897	20,60161
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	1,051	0,937	1,166	0,117	11,098	0,01361
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	1,132	0,896	1,369	0,241	21,296	0,05815
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	-	-	-	-	-	-

### 9.7.5 Myoglobin pH 5,00

MYOA-250602	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,90	10,0	4,394	0,918	0,124
Neostigmin	102,54	10,0	20,292	4,240	1,286
Myoglobin	19,65	10,0	0,278	0,058	0,986
SDS	1441,18	25,0	199,900	418,000	120,000

Der Trennpuffer pH 5,00 ( $100\text{ mmol l}^{-1}$ ) wird hergestellt durch Mischen von 10,0 ml Essigsäure ( $1\text{ mol l}^{-1}$ ) und 32,0 ml Natronlauge ( $0,20\text{ mol l}^{-1}$ ). Durch Auffüllen auf 100,0 ml mit bidest. Wasser wird die endgültige Konzentration von  $100\text{ mmol l}^{-1}$  eingestellt. Der Puffer wird vor Gebrauch steril filtriert.

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
GBH 02C	46-50	353	56	44

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
P Protein	20	9	10	30	40	153
K SDS	20	9	10	30	40	153

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	P Neostigmin	4,945	4,003	5,888	1,666	33,694	2,77651
Fläche [AU·min]	P Neostigmin	22,719	19,193	26,246	6,233	27,433	38,84558
korr. Fläche [AU]	P Neostigmin	5,055	4,055	6,055	1,767	34,962	3,12355
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K Neostigmin	6,489	6,192	6,786	0,678	10,450	0,45981
Fläche [AU·min]	K Neostigmin	12,769	12,036	13,503	1,673	13,101	2,79856
korr. Fläche [AU]	K Neostigmin	1,982	1,860	2,105	0,279	14,074	0,07784
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	P Acetanilid	13,288	7,485	19,090	6,620	49,819	43,82185
Fläche [AU·min]	P Acetanilid	11,280	6,865	15,696	5,038	44,661	25,38002
korr. Fläche [AU]	P Acetanilid	0,890	0,725	1,055	0,188	21,100	0,03527
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	P Acetanilid	1,217	0,786	1,648	0,492	40,399	0,24188
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K Acetanilid	6,523	6,278	6,769	0,516	7,915	0,26658
Fläche [AU·min]	K Acetanilid	1,561	1,349	1,773	0,447	28,616	0,19953
korr. Fläche [AU]	K Acetanilid	0,241	0,205	0,276	0,075	31,244	0,00566
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K Acetanilid	2,110	2,036	2,184	0,156	7,382	0,02426
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	22,674	22,028	23,321	0,572	2,521	0,32666
Fläche [AU·min]	Myoglobin	162,319	155,405	169,233	6,110	3,764	37,33172
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	7,165	6,677	7,654	0,432	6,027	0,18653

## 9.7.6 Myoglobin pH 5,00

MYOA-280602	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,90	10,0	4,394	0,918	0,124
Neostigmin	102,54	10,0	20,292	4,240	1,286
Myoglobin	19,65	10,0	0,278	0,058	0,986
SDS	1441,18	25,0	199,900	418,000	120,000

Der Trennpuffer pH 5,00 ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) wird hergestellt durch Mischen von 10,0 ml Essigsäure ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) und 32,0 ml Natronlauge ( $0,20 \text{ mol l}^{-1}$ ). Durch Auffüllen auf 100,0 ml mit bidest. Wasser wird die endgültige Konzentration von  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  eingestellt. Der Puffer wird vor Gebrauch steril filtriert.

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	54	41

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
P Protein	20	9	10	30	40	39
K SDS	20	9	10	30	40	39

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	P	Neostigmin	2,606	2,399	2,812	0,472	18,105	0,22255
Fläche [AU·min]	P	Neostigmin	6,572	4,905	8,238	3,802	57,860	14,45870
corr. Fläche [AU]	P	Neostigmin	2,778	1,926	3,631	1,945	70,019	3,78451
t <sub>Mig</sub> [min]	K	Peak 1	3,334	3,261	3,407	0,167	5,004	0,02783
Fläche [AU·min]	K	Peak 1	64,007	60,399	67,615	8,233	12,863	67,78687
corr. Fläche [AU]	K	Peak 1	19,238	18,170	20,305	2,436	12,662	5,93311
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	P	Acetanilid	5,091	4,301	5,880	1,395	27,413	1,94734
Fläche [AU·min]	P	Acetanilid	3,565	2,635	4,494	1,643	46,103	2,70059
corr. Fläche [AU]	P	Acetanilid	0,717	0,547	0,887	0,301	41,922	0,09030
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	P	Acetanilid	2,873	2,448	3,297	0,750	26,106	0,56241
t <sub>Mig</sub> [min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
corr. Fläche [AU]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-

## 9.7.7 Myoglobin pH 5,00

MYOA-120702	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>StammLSg</sub>	c (Probe 1)	c (Probe 2)	c (Probe 3)
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	nmol·ml <sup>-1</sup>	[nmol·ml <sup>-1</sup> ]	[nmol·ml <sup>-1</sup> ]
Acetanilid	9,86	10,0	0,431	215,645	323,467	0,000
Neostigmin	102,34	10,0	2,029	1014,585	1522,282	0,000
Myoglobin	18,20	10,0	0,026	12,885	19,327	0,000
SDS	1441,18	25,0	200,000	100,000	50,000	200,000

Der Trennpuffer pH 5,00 ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) wird hergestellt durch Mischen von 10,0 ml Essigsäure ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) und 32,0 ml Natronlauge ( $0,20 \text{ mol l}^{-1}$ ). Durch Auffüllen auf 100,0 ml mit bidest. Wasser wird die endgültige Konzentration von  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  eingestellt. Der Puffer wird vor Gebrauch steril filtriert.

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	54	41

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 100 mM SDS	7	18	10	28	40	38
K2 50 mM SDS	7	18	10	28	40	38
K0 200 mM SDS	7	18	10	28	40	38



## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 1	3,647	3,411	3,883	0,319	8,738	0,1016
Fläche	[AU·min]	Peak 1	2,867	2,328	3,406	0,727	25,366	0,5289
korr. Fläche	[AU]	Peak 1	0,802	0,604	1,000	0,267	33,336	0,0715
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 2	3,730	3,475	3,986	0,345	9,245	0,1189
Fläche	[AU·min]	Peak 2	2,304	1,589	3,019	0,965	41,907	0,9321
korr. Fläche	[AU]	Peak 2	0,601	0,440	0,762	0,217	36,192	0,0473
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 1	3,624	3,357	3,891	0,361	9,955	0,1301
Fläche	[AU·min]	Peak 1	0,613	0,496	0,730	0,157	25,676	0,0248
korr. Fläche	[AU]	Peak 1	0,174	0,130	0,218	0,059	34,212	0,0035
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 2	3,687	3,414	3,960	0,369	9,996	0,1358
Fläche	[AU·min]	Peak 2	2,730	2,240	3,219	0,661	24,211	0,4368
korr. Fläche	[AU]	Peak 2	0,760	0,573	0,947	0,252	33,195	0,0637
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 1	3,683	3,360	4,005	0,435	11,820	0,1895
Fläche	[AU·min]	Peak 1	7,378	4,741	10,016	3,561	48,257	12,6780
korr. Fläche	[AU]	Peak 1	2,112	1,221	3,002	1,202	56,920	1,4450
t <sub>Mig</sub>	[min]	Peak 2	4,018	3,772	4,264	0,333	8,278	0,1106
Fläche	[AU·min]	Peak 2	0,640	0,431	0,849	0,282	44,107	0,0797
korr. Fläche	[AU]	Peak 2	0,156	0,116	0,196	0,054	34,831	0,0030

### 9.7.8 Myoglobin pH 6,40

MYOA-060802	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,43	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,51	10,0	4,665	6,740	0,911
Neostigmin	100,24	10,0	19,837	28,659	8,689
Myoglobin	12,68	5,00	0,299	0,432	7,328

Phosphat-Puffer	pH	V [μl]	V [ml]	n [mmol]	n [mmol]
58,78 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l		H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	NaOH 2,5 mol · l <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,40	3,459	13,609	25,977	4,023
ist	6,43	3,450	13,600	25,205	4,183

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	54	41

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	25	20	30	28	8	64
P Protein	100	20	30	28	30	64
K2 SDS	6	20	30	28	30	117

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	K1 Neostigmin	1,611	1,603	1,619	0,020	1,225	0,00039
		P Neostigmin	3,138	2,970	3,307	0,858	27,339	0,73619
		K2 Neostigmin	-	-	-	-	-	-
Fläche	[AU·min]	K1 Neostigmin	24,800	24,624	24,975	0,449	1,810	0,20139
		P Neostigmin	139,338	129,372	149,303	50,846	36,492	2585,36253
		K2 Neostigmin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche	[AU]	K1 Neostigmin	15,396	15,315	15,477	0,208	1,349	0,04315
		P Neostigmin	43,878	42,366	45,389	7,711	17,574	59,46333
		K2 Neostigmin	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub>	[min]	K1 Acetanilid	2,474	2,461	2,486	0,031	1,250	0,00096
		P Acetanilid	12,831	11,163	14,498	8,291	64,621	68,74709
		K2 Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche	[AU·min]	K1 Acetanilid	8,364	8,321	8,408	0,111	1,327	0,01232
		P Acetanilid	87,306	75,729	98,883	57,572	65,942	3314,48639
		K2 Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche	[AU]	K1 Acetanilid	3,382	3,365	3,398	0,043	1,265	0,00183
		P Acetanilid	7,630	7,015	8,244	3,055	40,039	9,33233
		K2 Acetanilid	-	-	-	-	-	-

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz				$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid		6,872	6,838	6,905	0,085	1,240	0,00726
	P	Acetanilid		2,500	2,091	2,909	2,032	81,285	4,12950
	K2	Acetanilid		-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]	P	Myoglobin		6,497	2,748	10,246	7,652	117,764	58,54557
Fläche [AU·min]	P	Myoglobin		62,933	52,929	72,937	20,417	32,442	416,84811
korr. Fläche [AU]	P	Myoglobin		14,175	11,505	16,845	5,450	38,448	29,70219

### 9.7.9 Myoglobin pH 6,40

MYOA-210802	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,51	10,0	4,665	6,618	0,894
Neostigmin	100,24	10,0	19,837	28,138	8,531
Myoglobin	15,47	5,00	0,365	0,518	8,778

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,40	2945,97	596,76	21,647	3,353
ist	6,40	2944,08	473,06	21,633	3,332

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	55	42

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
P Protein	70	20	30	28	35	70
K Kontrolle 2	10	20	30	28	35	100

Substanz				$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	P	Neostigmin		2,132	1,905	2,359	0,694	32,565	0,48205
	K	Neostigmin		-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	P	Neostigmin		78,225	71,417	85,034	20,842	26,643	434,37902
	K	Neostigmin		-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	P	Neostigmin		37,484	35,872	39,096	4,935	13,167	24,35745
	K	Neostigmin		-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]	P	Acetanilid		3,994	3,435	4,552	1,637	40,986	2,67914
	K	Acetanilid		-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	P	Acetanilid		23,348	20,484	26,213	8,396	35,960	70,49405
	K	Acetanilid		-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	P	Acetanilid		6,840	5,468	8,212	4,021	58,796	16,17182
	K	Acetanilid		-	-	-	-	-	-
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	P	Acetanilid		5,242	4,666	5,818	1,689	32,220	2,85252
	K	Acetanilid		-	-	-	-	-	-
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Myoglobin		2,737	2,670	2,803	0,090	3,281	0,00806
Fläche [AU·min]		Myoglobin		8,176	4,921	11,430	4,394	53,745	19,30643
korr. Fläche [AU]		Myoglobin		2,994	1,817	4,170	1,588	53,046	2,52173

### 9.7.10 Myoglobin pH 6,40

MYOA-260802	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,11	10,0	4,488	5,835	0,789
Neostigmin	50,49	10,0	9,991	12,992	3,939
Myoglobin	10,51	5,00	0,248	0,323	5,466

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phoshat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,40	2945,97	596,76	21,647	3,353
ist	6,40	2944,08	473,06	21,633	3,332

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	55	42

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
P Protein	80	30	30	28	35	70
K Kontrolle SDS	35	30	30	28	35	70

Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min] P Neostigmin	3,591	3,421	3,762	0,778	21,656	0,60487
Fläche [AU·min] P Neostigmin	42,638	35,571	49,706	32,252	75,642	1040,21226
korr. Fläche [AU] P Neostigmin	13,399	11,077	15,722	10,599	79,104	112,34525
t <sub>Mig</sub> [min] P Acetanilid	13,086	11,486	14,686	6,683	51,072	44,66740
Fläche [AU·min] P Acetanilid	42,804	27,560	58,048	63,663	148,730	4052,91518
korr. Fläche [AU] P Acetanilid	5,091	2,194	7,989	12,101	237,674	146,42716
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] P Acetanilid	2,251	1,837	2,665	1,729	76,794	2,98815
t <sub>Mig</sub> [min] P Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min] P Myoglobin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU] P Myoglobin	-	-	-	-	-	-

### 9.7.11 Myoglobin pH 7,00

MYOA-130502	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	91,40	100,0	2,029	0,402	0,054
Neostigmin	102,12	10,0	10,104	2,004	0,608
Myoglobin	21,12	5,00	0,249	0,049	0,838

Phosphat-Puffer Lösung pH 7,00 (134 mmol Titrisol 1.09887 Merck KGaA, Darmstadt) wird auf 1,00 l mitbidest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung enthält 82 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 52 mmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	60	47

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
Protein	50	9	10	22	15	190

Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min] Neostigmin	1,973	1,960	1,985	0,044	2,236	0,00195
Fläche [AU·min] Neostigmin	21,137	20,365	21,910	2,758	13,050	7,60860
korr. Fläche [AU] Neostigmin	10,830	10,428	11,232	1,436	13,257	2,06129
t <sub>Mig</sub> [min] Acetanilid	3,202	3,189	3,215	0,046	1,435	0,00211
Fläche [AU·min] Acetanilid	5,981	5,698	6,264	1,000	16,714	0,99926
korr. Fläche [AU] Acetanilid	1,861	1,776	1,945	0,299	16,064	0,08932
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] Acetanilid	6,541	6,514	6,568	0,097	1,484	0,00942
t <sub>Mig</sub> [min] Myoglobin	3,772	3,749	3,794	0,064	1,700	0,00411
Fläche [AU·min] Myoglobin	3,421	2,807	4,036	1,745	51,014	3,04609
korr. Fläche [AU] Myoglobin	0,910	0,746	1,074	0,466	51,247	0,22000

## 9.7.12 Myoglobin pH 7,00

MYOA-160502	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	91,40	100,0	2,029	0,402	0,054
Neostigmin	102,12	10,0	10,104	2,004	0,608
Myoglobin	21,12	5,00	0,249	0,049	0,838

Phosphat-Puffer Lösung pH 7,00 (134 mmol Titrisol 1.09887 Merck KGaA, Darmstadt) wird auf 2,00 l mitbidest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung enthält 41 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 26 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	60	47

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
P Protein	20	9	10	25	30	120
K Kontrolle	7	9	10	25	30	120

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	P	Neostigmin	1.743	1.675	1.811	0.147	8.430	0.02160
Fläche [AU·min]	P	Neostigmin	17.993	17.288	18.698	1.526	8.481	2.32884
korr. Fläche [AU]	P	Neostigmin	10.395	9.828	10.962	1.227	11.808	1.50650
t <sub>Mig</sub> [min]	P	Acetanilid	2.562	2.476	2.647	0.180	7.020	0.03234
Fläche [AU·min]	P	Acetanilid	2.249	2.033	2.465	0.454	20.195	0.20633
korr. Fläche [AU]	P	Acetanilid	0.889	0.794	0.985	0.202	22.666	0.04063
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	P	Acetanilid	8.236	7.983	8.488	0.531	6.447	0.28194
t <sub>Mig</sub> [min]	P	Myoglobin	2.691	2.606	2.776	0.180	6.673	0.03224
Fläche [AU·min]	P	Myoglobin	4.737	4.186	5.287	1.158	24.452	1.34152
korr. Fläche [AU]	P	Myoglobin	1.783	1.560	2.007	0.470	26.360	0.22092

## 9.7.13 Myoglobin pH 8,40

MYOA-121101	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,4	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	91,40	100,0	2,029	2,809	0,380
Neostigmin	98,34	10,0	9,730	13,476	4,086
Myoglobin	19,82	5,00	0,234	0,324	5,490

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup>		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1001,76	712,92	19,941	3,739

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DUI 02A	79	360	62	47

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
Protein	20	9	10	17.5	8	43

Substanz		$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Neostigmin	3,111	3,105	3,116	0,015	0,478	0,00022
Fläche [AU·min]	Neostigmin	113,400	112,472	114,328	2,320	2,046	5,38303
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	36,456	36,184	36,728	0,680	1,866	0,46257

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz		$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,562	4,553	4,572	0,023	0,510	0,00054
Fläche [AU·min]	Acetanilid	24,616	24,448	24,783	0,419	1,704	0,17594
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	5,396	5,361	5,430	0,087	1,605	0,00750
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,436	5,425	5,447	0,028	0,511	0,00077
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	5,397	5,385	5,409	0,031	0,571	0,00095
Fläche [AU·min]	Myoglobin	92,834	92,031	93,638	2,008	2,163	4,03168
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	17,200	17,072	17,329	0,321	1,865	0,10293

### 9.7.14 Myoglobin pH 8,40

MYOA-131101	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,4	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	91,40	100,00	2,029	2,809	0,380
Neostigmin	98,34	10,00	9,730	13,476	4,086
Myoglobin	19,82	5,00	0,234	0,324	5,490

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup>		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1001,76	712,92	19,941	3,739

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DUI 02A	79	360	62	47

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
Protein	24	9	10	17,5	8	75

Substanz		$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Neostigmin	3,111	3,105	3,116	0,015	0,478	0,00022
Fläche [AU·min]	Neostigmin	113,400	112,472	114,328	2,320	2,046	5,38303
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	36,456	36,184	36,728	0,680	1,866	0,46257
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Acetanilid	4,684	4,644	4,725	0,077	1,654	0,00600
Fläche [AU·min]	Acetanilid	24,924	24,723	25,125	0,384	1,542	0,14779
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	5,322	5,253	5,391	0,132	2,472	0,01731
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Acetanilid	5,296	5,249	5,342	0,088	1,666	0,00778
$t_{\text{Mig}}$ [min]	Myoglobin	5,527	5,477	5,577	0,095	1,726	0,00910
Fläche [AU·min]	Myoglobin	95,166	94,044	96,287	2,141	2,250	4,58367
korr. Fläche [AU]	Myoglobin	17,220	17,012	17,427	0,396	2,297	0,15648

### 9.7.15 Myoglobin pH 8,40

MYOA-271202	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,4	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,52	10,0	4,670	0,448	0,061
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	50,63	10,0	24,086	24,299	3,065
Myoglobin	16,82	10,0	0,238	0,240	4,072

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup> 0,2 l		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,40	990,26	761,23	20,01	3,99
ist	8,41	987,23	723,67	19,76	3,80

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	60	47

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

	Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
Protein	30	18	25	29.5	8	56

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Melamin	3,084	0,013	0,413	0,000	3,079	3,08900
Fläche	[AU·min]	Melamin	336,542	2,389	0,710	5,705	335,687	337,39700
korr. Fläche	[AU]	Melamin	109,126	0,757	0,694	0,574	108,855	109,39700
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Melamin	6,226	0,026	0,410	0,001	6,217	6,23500
t <sub>Mig</sub>	[min]	Myoglobin	3,327	3,321	3,332	0,016	0,488	0,00026
Fläche	[AU·min]	Myoglobin	41,114	40,360	41,867	2,106	5,122	4,43429
korr. Fläche	[AU]	Myoglobin	12,361	12,125	12,596	0,659	5,332	0,43441

### 9.7.16 Myoglobin pH 9,20

MYOA-120901	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	97,80	100,0	2,171	0,235	0,032
Myoglobin	22,32	5,00	0,263	0,029	0,484

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	4767,13	25,00	25,00
ist	9,20	0,00	4765,73	25,00	25,00

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
AUL 02A	27	367	60	45

	Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
Protein	15	20	25	25	15	22

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	Acetanilid	3,656	3,626	3,686	0,060	1,632	0,00356
Fläche	[AU·min]	Acetanilid	10,033	9,660	10,406	0,737	7,344	0,54282
korr. Fläche	[AU]	Acetanilid	2,744	2,648	2,840	0,190	6,914	0,03598
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,815	4,776	4,854	0,077	1,599	0,00593
t <sub>Mig</sub>	[min]	Myoglobin	4,289	4,250	4,327	0,076	1,774	0,00579
Fläche	[AU·min]	Myoglobin	15,402	14,693	16,111	1,400	9,091	1,96039
korr. Fläche	[AU]	Myoglobin	3,594	3,420	3,767	0,343	9,544	0,11762

### 9.7.17 Myoglobin pH 9,20

MYOA-130901	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	97,80	100,0	2,171	0,235	0,032
Neostigmin	107,43	10,0	10,630	1,153	0,350
Myoglobin	21,67	5,00	0,256	0,028	0,470

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	4767,13	25,00	25,00
ist	9,20	0,00	4765,73	25,00	25,00

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
AUL 02A	27	367	60	45

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

	Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
Protein	15	20	25	25	15	22

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Neostigmin	2,860	2,794	2,926	0,130	4,559	0,01700
Fläche [AU·min]	Neostigmin	10,221	9,154	11,288	2,108	20,629	4,44547
korr. Fläche [AU]	Neostigmin	3,599	3,170	4,029	0,849	23,598	0,72144
t <sub>Mig</sub> [min]	Acetanilid	4,383	4,208	4,558	0,345	7,882	0,11936
Fläche [AU·min]	Acetanilid	13,584	12,643	14,524	1,859	13,683	3,45464
korr. Fläche [AU]	Acetanilid	3,088	2,972	3,205	0,230	7,441	0,05280
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	Acetanilid	4,130	3,968	4,292	0,320	7,741	0,10221
t <sub>Mig</sub> [min]	Myoglobin	5,226	4,974	5,479	0,499	9,549	0,24904
Fläche [AU·min]	Myoglobin	22,536	20,196	24,875	4,623	20,515	21,37349
korr. Fläche [AU]	Mvoglobin	4,285	3,960	4,610	0,642	14,982	0,41213

### 9.7.18 Myoglobin pH 9,20

MYOA-100502	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	13.20	10.0	5.859	1.368	0.185
Neostigmin	107.90	10.0	21.352	4.986	1.512
Myoglobin	22.46	10.0	0.265	0.062	1.049
SDS	1441.28	25.0	1,999	0,835	0,241

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
100 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 1,0 l		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	9,20	0,00	9534,25	50,000	50,000
ist	9,20	0,00	9524,14	49,992	49,992

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	48	363-369	59	47

	Läufe	$t_{Inj}$ [s]	$p_{Inj}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu$ A]
P Protein	20	9	10	28	15	39
K SDS	20	60	50	30	12	45

Substanz				$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	P	Neostigmin	2,300	2,275	2,325	0,057	2,484	0,00327
Fläche	[AU·min]	P	Neostigmin	28,705	26,739	30,671	4,486	15,628	20,12374
korr. Fläche	[AU]	P	Neostigmin	12,456	11,718	13,194	1,683	13,511	2,83231
t <sub>Mig</sub>	[min]	P	Acetanilid	3,582	2,962	4,202	1,414	39,470	1,99888
Fläche	[AU·min]	P	Acetanilid	1,956	1,108	2,804	1,935	98,940	3,74590
korr. Fläche	[AU]	P	Acetanilid	0,496	0,437	0,556	0,135	27,247	0,01829
EOF	[10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	P	Acetanilid	5,475	5,107	5,843	0,839	15,324	0,70392
t <sub>Mig</sub>	[min]	P	Myoglobin	4,266	3,315	5,217	2,170	50,867	4,70916
Fläche	[AU·min]	P	Myoglobin	11,490	9,415	13,566	4,736	41,216	22,42834
korr. Fläche	[AU]	P	Myoglobin	2,742	2,615	2,870	0,291	10,608	0,08461

Substanz				$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub>	[min]	K	SDS 1	5,914	5,866	5,963	0,111	1,869	0,01222
Fläche	[AU·min]	K	SDS 1	12,912	7,904	17,919	11,426	88,491	130,54582
korr. Fläche	[AU]	K	SDS 1	2,155	1,325	2,986	1,894	87,881	3,58804
t <sub>Mig</sub>	[min]	K	SDS 2	6,107	6,076	6,138	0,071	1,164	0,00506
Fläche	[AU·min]	K	SDS 2	24,559	17,312	31,806	16,536	67,332	273,44355
korr. Fläche	[AU]	K	SDS 2	4,017	2,839	5,195	2,688	66,907	7,22400
t <sub>Mig</sub>	[min]	K	SDS 3	6,232	6,205	6,258	0,061	0,985	0,00377
Fläche	[AU·min]	K	SDS 3	4,509	3,388	5,630	2,557	56,714	6,53943
korr. Fläche	[AU]	K	SDS 3	0,722	0,544	0,900	0,406	56,158	0,16450

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

---

t <sub>Mig</sub>	[min]	K	SDS gesamt	6,073	6,040	6,106	0,075	1,235	0,00562
Fläche	[AU·min]	K	SDS gesamt	152,344	149,711	154,978	6,009	3,945	36,11300
korr. Fläche	[AU]	K	SDS gesamt	25,096	24,573	25,620	1,194	4,759	1,42655



## 9.8 Myoglobin

### 9.8.1 Myoglobin pH 5,00

MYOG-110205	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	18,96	25,0	5,611	5,154	0,697
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	14,29	25,0	4,532	4,163	0,525
Myoglobin	14,86	5,00	0,351	0,322	5,460

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup>		CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa
soll	5,00	98,14	262,55	1,800	3,200
ist	5,01	98,00	263,33	1,755	3,210

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml  
 ist: 90,76 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ 05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	47
P Protein	30	12	30	25	30.00	47
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	45.00	47

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	3,189	3,166	3,212	0,065	2,031	0,00419
	P	Melamin	8,878	5,581	12,174	5,826	65,629	33,94502
	K2	Melamin	18,627	18,124	19,130	0,726	3,895	0,52650
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Melamin	98,885	98,361	99,409	1,464	1,481	2,14462
	P	Melamin	211,189	139,201	283,177	127,234	60,246	16188,463
	K2	Melamin	423,753	293,033	554,474	188,643	44,517	35586,149
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	31,025	30,697	31,353	0,918	2,959	0,84258
	P	Melamin	26,446	22,757	30,134	6,519	24,651	42,50045
	K2	Melamin	23,049	15,780	30,317	10,490	45,511	110,03396
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,536	4,489	4,584	0,132	2,914	0,01747
	P	Acetanilid	8,589	5,669	11,509	3,650	42,493	13,32024
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Acetanilid	58,058	57,425	58,692	1,770	3,048	3,13120
	P	Acetanilid	93,767	66,229	121,305	34,416	36,704	1184,45577
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	12,812	12,600	13,024	0,592	4,623	0,35088
	P	Acetanilid	11,151	10,420	11,881	0,913	8,183	0,83267
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,236	4,193	4,279	0,121	2,850	0,01457
	P	Acetanilid	2,549	1,804	3,294	0,931	36,516	0,86655
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot$ min]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	-	-	-	-	-	-

## 9.8.2 Myoglobin pH 5,50

MYOG-180205	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,95	5,00	7,324	6,728	0,909
Neostigmin	25,87	5,00	17,065	15,675	4,753
Myoglobin	15,70	5,00	0,371	0,340	5,769

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> 0,2 l		CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa
soll	5,50	82,33	696,54	1,510	8,490
ist	5,52	83,00	696,70	1,457	8,492

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml  
 ist: 89,03 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ 05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	5.00	59
P Protein	30	12	30	25	30.00	59
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	40.00	59

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,794	2,790	2,798	0,012	0,412	0,00013
	P	Neostigmin	6,066	5,607	6,525	1,282	21,141	1,64451
	K2	Neostigmin	6,721	6,654	6,789	0,188	2,797	0,03534
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Neostigmin	85,463	84,117	86,808	3,697	4,326	13,66866
	P	Neostigmin	174,699	162,652	186,746	33,665	19,270	1133,34560
	K2	Neostigmin	199,638	197,743	201,532	5,294	2,652	28,02740
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	30,593	30,093	31,094	1,375	4,495	1,89099
	P	Neostigmin	28,965	28,618	29,311	0,968	3,343	0,93749
	K2	Neostigmin	29,705	29,581	29,829	0,347	1,169	0,12066
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,521	4,498	4,543	0,063	1,384	0,00391
	P	Acetanilid	10,706	5,753	15,659	6,686	62,449	44,70152
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Acetanilid	61,410	60,487	62,334	2,536	4,130	6,43310
	P	Acetanilid	147,580	77,981	217,178	93,951	63,661	8826,82673
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	13,587	13,370	13,805	0,597	4,395	0,35653
	P	Acetanilid	13,718	13,420	14,016	0,403	2,934	0,16203
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,248	4,227	4,269	0,059	1,379	0,00343
	P	Acetanilid	2,328	1,513	3,144	1,101	47,281	1,21191
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		Myoglobin	16,683	16,097	17,269	1,496	8,967	2,23794
Fläche [AU $\cdot$ min]		Myoglobin	317,120	275,669	358,571	105,745	33,345	11181,981
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	18,601	16,655	20,548	4,966	26,698	24,66193

## 9.8.3 Myoglobin pH 6,00

MYOG-041004	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,25	10,0	7,583	6,965	0,942
Neostigmin	51,12	10,0	16,860	15,487	4,696
Myoglobin	29,56	10,0	0,349	0,320	5,430



## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	8.00	48
P Protein	30	12	30	25	30.00	48
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	15.00	48

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,395	2,386	2,404	0,025	1,051	0,00063
	P	Neostigmin	2,605	2,577	2,633	0,078	2,975	0,00601
	K2	Neostigmin	2,617	2,606	2,628	0,031	1,183	0,00096
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	49,277	48,339	50,215	2,621	5,319	6,87001
	P	Neostigmin	49,557	48,835	50,280	2,018	4,072	4,07308
	K2	Neostigmin	51,624	51,269	51,980	0,994	1,925	0,98731
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	20,579	20,185	20,972	1,100	5,346	1,21044
	P	Neostigmin	19,023	18,869	19,178	0,432	2,270	0,18652
	K2	Neostigmin	19,733	19,548	19,918	0,517	2,619	0,26706
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	3,757	3,731	3,782	0,072	1,910	0,00515
	P	Acetanilid	4,231	4,161	4,301	0,197	4,651	0,03873
	K2	Acetanilid	4,313	4,293	4,333	0,055	1,281	0,00305
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	25,613	25,095	26,132	1,450	5,662	2,10291
	P	Acetanilid	88,494	85,733	91,254	7,714	8,717	59,49965
	K2	Acetanilid	28,306	27,902	28,711	1,131	3,994	1,27844
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	6,820	6,679	6,961	0,393	5,763	0,15450
	P	Acetanilid	20,908	20,396	21,419	1,429	6,834	2,04157
	K2	Acetanilid	6,565	6,456	6,674	0,304	4,635	0,09259
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	5,113	5,079	5,147	0,095	1,861	0,00905
	P	Acetanilid	4,548	4,470	4,626	0,218	4,796	0,04758
		Acetanilid	4,452	4,432	4,473	0,057	1,269	0,00319
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Myoglobin	4,114	4,062	4,166	0,145	3,526	0,02104
Fläche [AU·min]		Myoglobin	21,657	19,886	23,428	4,950	22,857	24,50430
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	5,242	4,772	5,712	1,314	25,060	1,72565

### 9.8.5 Myoglobin pH 7,00

MYOG-281004	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,17	10,0	7,524	6,911	0,934
Neostigmin	50,68	10,0	16,715	15,354	4,655
Myoglobin	15,68	5,00	0,370	0,340	5,761

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	7,00	420.92	339.44	3.093	1.907
ist	7,00	420.92	339.44	3.093	1.907

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml  
ist: 225,09 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	8.00	62
P Protein	30	12	30	25	15.00	62
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	5.00	62

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,290	2,286	2,294	0,011	0,463	0,00011
	P	Neostigmin	2,293	2,282	2,304	0,032	1,393	0,00102
	K2	Neostigmin	2,191	2,184	2,197	0,019	0,873	0,00037
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	42,518	42,362	42,675	0,438	1,031	0,19228
	P	Neostigmin	43,696	43,543	43,850	0,429	0,981	0,18377
	K2	Neostigmin	41,880	41,617	42,142	0,733	1,751	0,53748
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	18,569	18,479	18,658	0,250	1,348	0,06267
	P	Neostigmin	19,058	18,965	19,152	0,261	1,369	0,06809
	K2	Neostigmin	19,119	19,015	19,223	0,291	1,522	0,08466

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,551	3,544	3,558	0,019	0,526	0,00035
	P	Acetanilid	3,535	3,516	3,555	0,054	1,516	0,00287
	K2	Acetanilid	3,348	3,335	3,361	0,038	1,121	0,00141
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	26,322	26,232	26,412	0,251	0,954	0,06302
	P	Acetanilid	72,720	72,257	73,183	1,293	1,779	1,67312
	K2	Acetanilid	25,831	25,590	26,072	0,673	2,604	0,45229
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,413	7,387	7,439	0,073	0,988	0,00536
	P	Acetanilid	20,405	20,175	20,634	0,641	3,142	0,41101
	K2	Acetanilid	7,716	7,639	7,794	0,217	2,809	0,04697
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	5,407	5,397	5,418	0,029	0,531	0,00082
	P	Acetanilid	5,432	5,402	5,462	0,083	1,531	0,00691
	K2	Acetanilid	5,735	5,713	5,758	0,064	1,110	0,00405
t <sub>Mig</sub> [min]		Myoglobin	3,565	3,546	3,585	0,054	1,503	0,00287
Fläche [AU·min]		Myoglobin	46,643	46,181	47,106	1,293	2,773	1,67312
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	20,405	20,175	20,634	0,641	3,142	0,41101

### 9.8.6 Myoglobin pH 8,00

MYOG-031104	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,86	10,0	7,295	6,700	0,906
Neostigmin	50,88	10,0	16,781	15,414	4,674
Myoglobin	17,00	5,00	0,401	0,369	6,246

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	8,00	94,96	765,76	0,698	4,302
ist	8,00	95,24	766,13	0,700	4,304

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0ml  
 ist: 225,28 mg/25,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	78
P Protein	30	12	30	25	6.00	78
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	6.00	78

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	1,752	1,748	1,756	0,012	0,682	0,00014
	P	Neostigmin	1,792	1,786	1,799	0,019	1,069	0,00037
	K2	Neostigmin	1,828	1,822	1,834	0,017	0,909	0,00028
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	38,802	38,617	38,988	0,518	1,335	0,26850
	P	Neostigmin	37,930	37,825	38,035	0,293	0,774	0,08612
	K2	Neostigmin	38,813	38,642	38,983	0,475	1,225	0,22600

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	22,148	22,029	22,268	0,334	1,506	0,11129
	P	Neostigmin	21,164	21,074	21,253	0,251	1,185	0,06285
	K2	Neostigmin	21,237	21,126	21,348	0,310	1,457	0,09579
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	2,494	2,488	2,500	0,017	0,684	0,00029
	P	Acetanilid	2,560	2,549	2,570	0,030	1,167	0,00089
	K2	Acetanilid	2,593	2,587	2,599	0,017	0,642	0,00028
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	19,162	19,088	19,236	0,207	1,082	0,04296
	P	Acetanilid	18,545	18,456	18,634	0,248	1,340	0,06172
	K2	Acetanilid	19,019	18,924	19,114	0,265	1,396	0,07047
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,684	7,649	7,719	0,098	1,276	0,00962
	P	Acetanilid	7,246	7,211	7,280	0,097	1,342	0,00945
	K2	Acetanilid	7,335	7,297	7,373	0,106	1,439	0,01115
EOF $[10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	7,700	7,681	7,718	0,052	0,680	0,00274
	P	Acetanilid	7,502	7,470	7,533	0,088	1,171	0,00772
	K2	Acetanilid	7,405	7,388	7,422	0,048	0,644	0,00228
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Myoglobin	2,769	2,758	2,780	0,031	1,122	0,00096
Fläche [AU·min]		Myoglobin	48,705	48,503	48,907	0,564	1,158	0,31804
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	17,592	17,501	17,684	0,255	1,447	0,06485

### 9.8.7 Myoglobin pH 8,40

MYOG-150903	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,83	10,0	8,727	10,020	1,354
Neostigmin	48,46	10,0	12,786	14,681	4,451
Myoglobin	19,23	10,0	0,227	0,261	4,416

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$ (0,2 l)		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1006,42	710,62	19,943	3,727

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0ml  
ist: 225,37 mg/25,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	20	18	25	25	3.50	36
P Protein	30	18	25	25	6.00	36
K2 Kontrolle 2	10	18	25	25	6.00	36

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	1,918	1,908	1,929	0,024	1,265	0,00059
	P	Neostigmin	1,840	1,836	1,844	0,011	0,611	0,00013
	K2	Neostigmin	1,855	1,854	1,857	0,003	0,145	0,00001
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	61,035	60,352	61,717	1,557	2,552	2,42577
	P	Neostigmin	62,019	61,636	62,401	1,068	1,723	1,14134
	K2	Neostigmin	60,032	59,608	60,456	0,685	1,140	0,46875
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	31,816	31,490	32,142	0,744	2,337	0,55282
	P	Neostigmin	33,706	33,448	33,964	0,720	2,137	0,51896
	K2	Neostigmin	32,357	32,124	32,589	0,375	1,160	0,14087
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	2,607	2,592	2,621	0,033	1,284	0,00112
	P	Acetanilid	2,518	2,514	2,523	0,012	0,493	0,00015
	K2	Acetanilid	2,533	2,531	2,536	0,004	0,159	0,00002
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	34,032	33,613	34,452	0,957	2,812	0,91569
	P	Acetanilid	30,028	29,610	30,446	1,168	3,889	1,36379
	K2	Acetanilid	31,421	31,096	31,746	0,524	1,669	0,27504

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	13,057	12,902	13,213	0,355	2,721	0,12626
	P	Acetanilid	11,925	11,747	12,104	0,499	4,181	0,24861
	K2	Acetanilid	12,402	12,272	12,532	0,210	1,690	0,04394
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	7,367	7,326	7,408	0,094	1,272	0,00878
	P	Acetanilid	7,624	7,611	7,638	0,038	0,493	0,00141
		Acetanilid	7,578	7,571	7,586	0,012	0,159	0,00015
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Myoglobin	2,740	2,736	2,744	0,011	0,415	0,00013
Fläche [AU·min]		Myoglobin	49,678	48,456	50,899	3,413	6,870	11,64629
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	18,133	17,674	18,592	1,283	7,073	1,64518

### 9.8.8 Myoglobin pH 9,20

MYOG-091204	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,48	10,0	7,753	7,122	0,963
Neostigmin	49,89	10,0	16,455	15,114	4,583
Myoglobin	15,09	5,00	0,356	0,327	5,544

Borat-Puffer	pH	m [mg] B(OH) <sub>3</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	n [mmol] H[B(OH) <sub>4</sub> ]	n [mmol] [B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
100 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	9,20	0,00	953,43	5,000	5,000
ist	9,20	0,00	953,45	5,000	5,000

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,00ml  
ist: 225,37 mg/25,00ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ 05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	4.00	38
P Protein	30	12	30	25	8.00	38
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	8.00	38

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,050	2,046	2,055	0,012	0,590	0,00015
	P	Neostigmin	2,062	2,051	2,073	0,031	1,503	0,00096
	K2	Neostigmin	2,124	2,120	2,128	0,010	0,471	0,00010
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	52,376	52,278	52,475	0,274	0,523	0,07516
	P	Neostigmin	55,738	55,551	55,924	0,522	0,937	0,27268
	K2	Neostigmin	53,074	52,924	53,225	0,420	0,791	0,17624
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	25,545	25,474	25,615	0,197	0,772	0,03890
	P	Neostigmin	27,037	26,883	27,190	0,429	1,587	0,18407
	K2	Neostigmin	24,988	24,910	25,067	0,219	0,877	0,04806
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	2,904	2,899	2,908	0,013	0,431	0,00016
	P	Acetanilid	2,921	2,905	2,937	0,044	1,502	0,00193
	K2	Acetanilid	3,014	3,011	3,017	0,009	0,314	0,00009
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	29,948	29,867	30,029	0,227	0,758	0,05149
	P	Acetanilid	33,318	33,200	33,435	0,328	0,983	0,10732
	K2	Acetanilid	30,536	30,450	30,621	0,240	0,785	0,05747
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	10,314	10,278	10,350	0,100	0,973	0,01007
	P	Acetanilid	11,409	11,352	11,465	0,159	1,391	0,02520
	K2	Acetanilid	10,132	10,102	10,161	0,082	0,814	0,00680
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1	Acetanilid	6,612	6,602	6,622	0,029	0,431	0,00081
	P	Acetanilid	6,575	6,540	6,610	0,098	1,494	0,00964
		Acetanilid	6,370	6,363	6,378	0,020	0,315	0,00040
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Myoglobin	3,353	3,336	3,370	0,047	1,407	0,00223
Fläche [AU·min]		Myoglobin	68,167	67,831	68,503	0,938	1,376	0,88004
korr. Fläche [AU]		Myoglobin	20,332	20,211	20,453	0,339	1,668	0,11500

## 9.9 Ovalbumin

### 9.9.1 Ovalbumin pH 5,00

OVAl-300904	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 5,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,25	10,0	7,583	6,965	0,942
Neostigmin	51,12	10,0	16,860	15,487	4,696
Ovalbumin	24,53	5,00	0,230	0,211	9,013

Acetat-Puffer	pH	V [ $\mu\text{l}$ ]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup>		CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
soll	5,00	98,14	262,55	1,800	3,200
ist	5,01	97	263,79	1,755	3,215

NaCl-Lsg 154 mmol $\cdot$ ml<sup>-1</sup> soll: 450,00 mg/50,0ml  
 ist: 450,70 mg/50,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	43
P	Protein	30	12	30	25	25.00	43
K2	Kontrolle 2	40	12	30	25	40.00	43

Substanz			$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,983	2,975	2,991	0,023	0,761	0,00051
	P	Neostigmin	5,276	4,906	5,645	1,033	19,579	1,06698
	K2	Neostigmin	6,290	6,252	6,328	0,106	1,684	0,01122
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Neostigmin	65,003	64,501	65,505	1,404	2,160	1,97113
	P	Neostigmin	112,106	104,924	119,289	20,071	17,903	402,83277
	K2	Neostigmin	129,888	127,769	132,006	5,920	4,558	35,05037
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	21,795	21,601	21,990	0,544	2,498	0,29643
	P	Neostigmin	21,332	21,145	21,519	0,522	2,448	0,27273
	K2	Neostigmin	20,646	20,377	20,915	0,752	3,644	0,56588
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	5,030	5,014	5,046	0,044	0,883	0,00197
	P	Acetanilid	11,754	8,905	14,604	5,440	46,279	29,59081
	K2	Acetanilid	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000
Fläche [AU $\cdot$ min]	K1	Acetanilid	40,098	39,819	40,377	0,781	1,948	0,60994
	P	Acetanilid	98,428	76,093	120,763	42,638	43,319	1818,03244
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,973	7,910	8,035	0,174	2,183	0,03028
	P	Acetanilid	8,498	8,302	8,693	0,373	4,389	0,13911
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,817	3,805	3,830	0,034	0,895	0,00117
	P	Acetanilid	1,968	1,531	2,404	0,834	42,378	0,69524
	K2	Acetanilid	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	-	-	-	-	-	-
Fläche [AU $\cdot$ min]		Ovalbumin	-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	-	-	-	-	-	-



## 9.9.2 Ovalbumin pH 6,00

OVAL-160604	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,03	10,0	7,420	6,816	0,921
Neostigmin	48,82	10,0	16,102	14,790	4,484
Ovalbumin	49,47	10,0	0,231	0,213	9,088

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	641,23	52,08	4,712	0,293

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0 ml  
ist: 91,78 mg/10,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	5.00	53
P Protein	30	12	30	25	8.00	53
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	8.00	53
K2 Kontrolle 2	12	12	30	25	12.00	53

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,321	2,310	2,332	0,031	1,316	0,00093
	P	Neostigmin	2,431	2,422	2,440	0,026	1,060	0,00066
	K2	Neostigmin	2,995	2,858	3,131	0,381	12,710	0,14487
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	48,284	47,977	48,591	0,858	1,777	0,73629
	P	Neostigmin	49,197	48,699	49,695	1,391	2,828	1,93546
	K2	Neostigmin	51,101	50,304	51,898	2,228	4,360	4,96322
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	20,806	20,634	20,977	0,480	2,306	0,23014
	P	Neostigmin	20,241	19,979	20,504	0,733	3,622	0,53764
	K2	Neostigmin	17,271	16,640	17,901	1,762	10,202	3,10453
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,658	3,636	3,680	0,062	1,684	0,00379
	P	Acetanilid	3,852	3,833	3,871	0,052	1,361	0,00275
	K2	Acetanilid	5,618	5,126	6,109	1,328	23,636	1,76293
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	28,512	28,315	28,710	0,552	1,937	0,30498
	P	Acetanilid	29,636	29,536	29,736	0,280	0,943	0,07814
	K2	Acetanilid	37,111	34,823	39,399	6,178	16,647	38,16857
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,795	7,742	7,848	0,148	1,899	0,02192
	P	Acetanilid	7,695	7,642	7,749	0,150	1,949	0,02249
	K2	Acetanilid	6,724	6,509	6,940	0,582	8,660	0,33909
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	5,250	5,218	5,282	0,089	1,696	0,00793
	P	Acetanilid	4,985	4,961	5,010	0,068	1,364	0,00463
		Acetanilid	3,609	3,294	3,923	0,849	23,539	0,72161
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	5,171	5,139	5,202	0,089	1,718	0,00789
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	123,210	122,582	123,837	1,753	1,423	3,07397
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	23,839	23,609	24,068	0,642	2,692	0,41186

## 9.9.3 Ovalbumin pH 6,00

OVAL-260904	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,25	10,0	7,583	6,965	0,942
Neostigmin	51,12	10,0	16,860	15,487	4,696
Ovalbumin	25,51	5,00	0,239	0,219	9,373

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l					
soll	6,00	3204,653	258,434	23,548	1,452
ist	5,97	3402,65	258,59	25,003	1,453

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 450,00 mg/50,0ml

ist: 450,07 mg/50,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	8.00	57
P	Protein	30	12	30	25	10.00	57
K2	Kontrolle 2	40	12	30	25	20.00	57

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	3,141	3,096	3,187	0,128	4,063	0,01629
	P	Neostigmin	2,960	2,943	2,976	0,046	1,558	0,00213
	K2	Neostigmin	2,879	2,850	2,907	0,075	2,589	0,00556
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	65,720	64,928	66,513	2,215	3,370	4,90555
	P	Neostigmin	55,604	54,762	56,446	2,352	4,230	5,53325
	K2	Neostigmin	52,326	51,236	53,416	2,835	5,419	8,03963
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	20,928	20,838	21,019	0,252	1,206	0,06370
	P	Neostigmin	18,783	18,584	18,982	0,556	2,961	0,30934
	K2	Neostigmin	18,174	17,858	18,489	0,821	4,515	0,67329
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	5,83	5,661	5,994	0,465	7,976	0,21603
	P	Acetanilid	5,161	5,076	5,247	0,240	4,649	0,05759
	K2	Acetanilid	4,992	4,896	5,089	0,251	5,018	0,06276
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	45,032	43,821	46,244	3,386	7,519	11,46607
	P	Acetanilid	37,562	36,513	38,611	2,932	7,805	8,59424
	K2	Acetanilid	33,815	32,813	34,817	2,607	7,710	6,79648
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,731	7,696	7,766	0,098	1,264	0,00954
	P	Acetanilid	7,269	7,187	7,352	0,230	3,161	0,05279
	K2	Acetanilid	6,771	6,639	6,902	0,342	5,050	0,11691
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	3,313	3,228	3,399	0,239	7,224	0,05729
	P	Acetanilid	3,726	3,675	3,778	0,144	3,872	0,02082
	K2	Acetanilid	3,854	3,787	3,921	0,174	4,519	0,03034
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	7,317	7,265	7,369	0,143	1,958	0,02052
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	15,031	14,710	15,351	0,881	5,864	0,77690
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	2,053	2,021	2,086	0,089	4,348	0,00797

### 9.9.4 Ovalbumin pH 6,00

OVAL-230505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,37	5,00	6,466	5,939	0,803
Neostigmin	20,50	5,00	13,523	12,421	3,766
Ovalbumin	28,50	5,00	0,267	0,245	10,471

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	640,51	51,56	4,707	0,290

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0 ml

ist: 224,66 mg/25,0 ml

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	8.00	54
P Protein	30	12	30	25	10.00	54
K2 Kontrolle 2	40	12	30	25	20.00	54

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	3,052	3,031	3,072	0,057	1,858	0,00322
	P	Neostigmin	3,089	3,083	3,094	0,015	0,498	0,00024
	K2	Neostigmin	3,259	3,095	3,424	0,523	16,046	0,27355
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	59,105	58,619	59,591	1,358	2,297	1,84292
	P	Neostigmin	56,942	55,606	58,278	3,733	6,556	13,93577
	K2	Neostigmin	61,711	57,681	65,742	12,843	20,811	164,94110
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	19,375	19,162	19,589	0,598	3,086	0,35748
	P	Neostigmin	18,440	17,991	18,889	1,255	6,804	1,57396
	K2	Neostigmin	18,885	18,179	19,592	2,251	11,918	5,06596
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	5,600	5,525	5,676	0,211	3,763	0,04440
	P	Acetanilid	5,613	5,600	5,626	0,036	0,633	0,00126
	K2	Acetanilid	7,426	6,236	8,615	3,838	51,685	14,73099
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	44,551	43,851	45,251	1,956	4,390	3,82574
	P	Acetanilid	41,392	41,067	41,718	0,910	2,198	0,82738
	K2	Acetanilid	66,543	51,811	81,274	47,536	71,437	2259,71630
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,955	7,890	8,020	0,181	2,277	0,03280
	P	Acetanilid	7,375	7,312	7,438	0,176	2,386	0,03096
	K2	Acetanilid	8,503	8,186	8,820	1,023	12,036	1,04729
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,433	3,388	3,478	0,126	3,658	0,01577
	P	Acetanilid	3,421	3,413	3,429	0,022	0,642	0,00048
	K2	Acetanilid	3,057	2,752	3,361	0,983	32,171	0,96702
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Ovalbumin	8,712	8,686	8,738	0,072	0,823	0,00515
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	184,612	182,172	187,051	6,818	3,693	46,48049
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	21,193	20,901	21,485	0,816	3,848	0,66517

### 9.9.5 Ovalbumin pH 6,50

OVAl-010604	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,03	10,0	7,420	6,816	0,921
Neostigmin	48,82	10,0	16,102	14,790	4,484
Ovalbumin	23,53	10,0	0,220	0,202	8,645

Phosphat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
50 mmol · l <sup>-1</sup>		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	570,40	146,90	4,191	0,825

NaCl-Lsg 154 mmol · ml<sup>-1</sup> soll: 90,00 mg/10,0ml

ist: 90,16 mg/10,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	10.00	62
P Protein	30	12	30	25	15.00	62
K2 Kontrolle 2	20	12	30	25	15.00	62

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,716	2,684	2,748	0,090	3,298	0,00802
	P	Neostigmin	2,647	2,638	2,657	0,026	0,982	0,00068
	K2	Neostigmin	2,495	2,477	2,514	0,041	1,659	0,00171
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	49,372	48,491	50,254	2,463	4,988	6,06456
	P	Neostigmin	45,898	45,517	46,280	1,066	2,323	1,13651
	K2	Neostigmin	45,873	44,993	46,752	2,007	4,375	4,02773
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	18,176	17,987	18,366	0,531	2,919	0,28157
	P	Neostigmin	17,337	17,218	17,456	0,333	1,923	0,11118
	K2	Neostigmin	18,385	18,031	18,740	0,809	4,401	0,65478
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,680	4,575	4,785	0,294	6,278	0,08631
	P	Acetanilid	4,327	4,305	4,348	0,059	1,367	0,00350
	K2	Acetanilid	4,029	3,991	4,068	0,088	2,193	0,00781
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	33,352	32,521	34,182	2,321	6,960	5,38881
	P	Acetanilid	30,037	29,823	30,251	0,599	1,994	0,35860
	K2	Acetanilid	30,007	29,322	30,693	1,563	5,210	2,44432
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	7,126	7,061	7,190	0,181	2,535	0,03262
	P	Acetanilid	6,943	6,901	6,985	0,117	1,688	0,01374
	K2	Acetanilid	7,448	7,283	7,614	0,377	5,065	0,14234
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	4,117	4,031	4,203	0,241	5,844	0,05789
	P	Acetanilid	4,438	4,417	4,460	0,061	1,375	0,00372
		Acetanilid	4,767	4,722	4,812	0,103	2,162	0,01063
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	6,748	6,692	6,804	0,157	2,325	0,02462
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	136,115	131,132	141,097	13,451	9,882	180,93859
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	20,095	19,464	20,727	1,705	8,485	2,90752

### 9.9.6 Ovalbumin pH 6,50

OVAL-120505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,37	10,0	6,932	6,367	0,861
Neostigmin	44,96	10,0	14,829	13,621	4,130
Ovalbumin	27,47	5,00	0,257	0,236	10,093

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	571,84	146,12	4,202	0,821

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 225,00 mg/25,0 ml  
ist: 228,13 mg/25,0 ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DRR 05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	65
P Protein	30	12	30	25	10.00	65
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	7.00	65

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,285	2,280	2,291	0,016	0,692	0,00025
	P	Neostigmin	2,272	2,264	2,279	0,020	0,892	0,00041
	K2	Neostigmin	2,316	2,314	2,318	0,007	0,294	0,00005
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	61,251	61,062	61,440	0,528	0,863	0,27930
	P	Neostigmin	63,003	62,095	63,911	2,538	4,029	6,44211
	K2	Neostigmin	60,042	59,712	60,373	0,924	1,539	0,85359
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	26,802	26,737	26,867	0,182	0,679	0,03313
	P	Neostigmin	27,739	27,321	28,157	1,167	4,207	1,36176
	K2	Neostigmin	25,925	25,773	26,078	0,427	1,645	0,18192

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,707	3,698	3,716	0,025	0,670	0,00062
	P	Acetanilid	3,680	3,667	3,693	0,036	0,966	0,00126
	K2	Acetanilid	3,749	3,747	3,751	0,006	0,167	0,00004
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	42,235	42,113	42,357	0,340	0,805	0,11552
	P	Acetanilid	42,873	42,518	43,228	0,992	2,315	0,98469
	K2	Acetanilid	41,726	41,479	41,973	0,690	1,654	0,47622
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	11,393	11,360	11,425	0,090	0,794	0,00817
	P	Acetanilid	11,652	11,528	11,776	0,346	2,971	0,11985
	K2	Acetanilid	11,130	11,060	11,200	0,196	1,761	0,03841
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	5,179	5,167	5,192	0,035	0,671	0,00121
	P	Acetanilid	5,218	5,200	5,236	0,050	0,965	0,00253
		Acetanilid	5,121	5,118	5,125	0,009	0,167	0,00007
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	5,543	5,522	5,563	0,057	1,033	0,00328
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	223,278	220,581	225,975	7,537	3,375	56,80127
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	40,284	39,795	40,773	1,367	3,393	1,86827

### 9.9.7 Ovalbumin pH 7,00

OVAL-210703	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,04	10,0	11,142	10,234	1,383
Neostigmin	50,50	10,0	16,656	15,299	4,639
Ovalbumin	30,06	10,0	0,281	0,258	11,045

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	420,92	339,44	3,093	1,907
ist	7,00	421,04	340,64	3,094	1,914

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	17*	6.00	103
P Protein	30	12	30	17*	6.00	103
K2 Kontrolle 2	15	12	30	17*	6.00	103

\* Anzeigefehler des Gerätes

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,046	2,023	2,069	0,064	3,124	0,00408
	P	Neostigmin	2,039	2,029	2,049	0,028	1,382	0,00079
	K2	Neostigmin	2,093	2,081	2,104	0,023	1,077	0,00051
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	264,344	262,788	265,899	4,348	1,645	18,90124
	P	Neostigmin	259,553	258,302	260,805	3,497	1,347	12,22920
	K2	Neostigmin	267,778	266,454	269,102	2,616	0,977	6,84582
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	129,282	128,237	130,327	2,920	2,259	8,52551
	P	Neostigmin	127,325	126,665	127,985	1,844	1,448	3,40103
	K2	Neostigmin	127,959	127,399	128,519	1,107	0,865	1,22594
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,097	3,054	3,139	0,119	3,855	0,01425
	P	Acetanilid	3,105	3,088	3,122	0,046	1,492	0,00215
	K2	Acetanilid	3,164	3,149	3,179	0,030	0,954	0,00091
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	209,610	207,444	211,775	6,051	2,887	36,61620
	P	Acetanilid	212,269	211,468	213,069	2,237	1,054	5,00572
	K2	Acetanilid	209,238	207,954	210,521	2,536	1,212	6,43109
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	67,718	67,297	68,138	1,175	1,735	1,37971
	P	Acetanilid	68,381	67,882	68,880	1,395	2,040	1,94519
	K2	Acetanilid	66,146	65,471	66,821	1,334	2,017	1,78028

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1 P	Acetanilid	9,130	9,011	9,250	0,334	3,662	0,11178
		Acetanilid	9,095	9,047	9,144	0,135	1,486	0,01828
		Acetanilid	8,925	8,881	8,970	0,088	0,980	0,00766
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Ovalbumin	4,493	4,466	4,520	0,074	1,655	0,00553
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	735,875	730,266	741,483	15,673	2,130	245,65715
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	163,835	162,139	165,532	4,742	2,894	22,48655

### 9.9.8 Ovalbumin pH 8,40

OVAl-070703	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 8,40	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23.02	25.0	6.812	7.822	1.057
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40.20	25.0	12.750	14.639	1.846
Ovalbumin	24.36	10.0	0.228	0.262	11.188

Borat-Puffer	pH	m [mg]	m [mg]	n [mmol]	n [mmol]
120 mmol · l <sup>-1</sup> (0,2 l)		B(OH) <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	H[B(OH) <sub>4</sub> ]	[B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
soll	8,50	990,26	761,23	20,008	3,992
ist	8,40	1006,42	710,62	19,943	3,727

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	15	18	25	25	3.00	41
P Protein	30	18	25	25	10.00	41
K2 Kontrolle 2	15	18	25	25	10.00	41

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1 P K2	Melamin	2,131	2,128	2,133	0,005	0,254	0,00003
		Melamin	2,165	2,153	2,177	0,034	1,556	0,00114
		Melamin	2,218	2,206	2,231	0,024	1,089	0,00058
Fläche [AU·min]	K1 P K2	Melamin	209,055	208,000	210,110	2,085	0,997	4,34791
		Melamin	200,309	199,810	200,808	1,394	0,696	1,94215
		Melamin	202,531	201,690	203,371	1,661	0,820	2,75748
korr. Fläche [AU]	K1 P K2	Melamin	98,122	97,699	98,545	0,836	0,852	0,69837
		Melamin	92,564	91,871	93,257	1,937	2,092	3,75068
		Melamin	91,307	90,771	91,843	1,060	1,160	1,12267
EOF $[10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$	K1 P	Melamin	9,012	9,000	9,023	0,023	0,253	0,00052
		Melamin	8,872	8,822	8,921	0,139	1,562	0,01919
		Melamin	8,656	8,608	8,704	0,095	1,102	0,00911
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Ovalbumin	3,060	3,040	3,081	0,057	1,847	0,00320
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	129,664	128,093	131,235	4,389	3,385	19,26671
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	42,385	41,762	43,008	1,740	4,105	3,02800

### 9.9.9 Ovalbumin pH 9,20

OVAl-290603	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 9,20	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	23,03	25,0	6,815	7,825	1,058
2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin	40,20	25,0	12,750	14,639	1,846
Ovalbumin	26,10	10,0	0,244	0,280	11,987

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Borat-Puffer	pH	m [mg] B(OH) <sub>3</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	n [mmol] H[B(OH) <sub>4</sub> ]	n [mmol] [B(OH) <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
100 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l					
soll	9,20	0,00	4767,13	25,000	25,000
ist	9,20	0,00	4767,83	25,004	25,004

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
XFZ-05A	50	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	15	18	25	25	20.00	38
P Protein	30	18	25	25	20.00	38
K2 Kontrolle 2	15	18	25	25	20.00	38

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Melamin	2,766	2,738	2,795	0,057	2,059	0,00325
	P	Melamin	2,774	2,753	2,795	0,059	2,126	0,00348
	K2	Melamin	2,809	2,796	2,822	0,026	0,924	0,00067
Fläche [AU·min]	K1	Melamin	260,979	255,732	266,226	10,369	3,973	107,51007
	P	Melamin	268,885	265,783	271,986	8,667	3,223	75,11819
	K2	Melamin	284,710	278,923	290,496	11,435	4,016	130,76080
korr. Fläche [AU]	K1	Melamin	94,354	92,583	96,125	3,500	3,709	12,24864
	P	Melamin	96,949	96,032	97,866	2,562	2,643	6,56415
	K2	Melamin	101,352	99,621	103,083	3,421	3,375	11,70326
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Melamin	6,943	6,872	7,015	0,141	2,036	0,01999
	P	Melamin	6,925	6,873	6,978	0,148	2,133	0,02181
		Melamin	6,837	6,805	6,868	0,063	0,918	0,00393
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	4,048	4,012	4,085	0,101	2,503	0,01027
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	307,231	304,922	309,540	6,452	2,100	41,62861
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	75,922	75,176	76,669	2,086	2,747	4,35105

## 9.10 Dialyse Ovalbumin

### 9.10.1 Ovalbumin pH 6,00

D-OVAL-230904	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,25	10,0	7,583	6,965	0,942
Neostigmin	51,12	10,0	16,860	15,487	4,696
Ovalbumin	125,78	25,0	0,235	0,216	9,243

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	643,63	51,37	4,729	0,289

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 900,00 mg/100,0ml  
ist: 899,96 mg/100,2ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	49
P	Protein	30	12	30	25	25.00	49
K2	Kontrolle 2	30	12	30	25	25.00	49

Substanz			$\bar{x}$	$\bar{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,796	2,766	2,827	0,085	3,050	0,00728
	P	Neostigmin	2,996	2,812	3,180	0,514	17,141	0,26377
	K2	Neostigmin	3,315	3,179	3,451	0,379	11,441	0,14383
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	53,137	52,314	53,960	2,300	4,329	5,29158
	P	Neostigmin	60,761	56,551	64,971	11,765	19,362	138,40671
	K2	Neostigmin	69,094	65,713	72,474	9,448	13,674	89,25775
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	19,039	18,560	19,519	1,340	7,038	1,79554
	P	Neostigmin	20,237	19,960	20,513	0,773	3,821	0,59801
	K2	Neostigmin	20,811	20,535	21,087	0,771	3,702	0,59367
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	4,774	4,704	4,845	0,197	4,127	0,03882
	P	Acetanilid	6,082	5,062	7,101	2,850	46,858	8,12086
	K2	Acetanilid	6,874	6,144	7,604	2,041	29,688	4,16456
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	32,599	31,637	33,560	2,687	8,242	7,21857
	P	Acetanilid	53,491	39,136	67,845	40,114	74,993	1609,15151
	K2	Acetanilid	55,440	47,512	63,368	22,155	39,963	490,86414
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	6,857	6,571	7,142	0,799	11,650	0,63804
	P	Acetanilid	8,245	7,696	8,794	1,534	18,607	2,35380
	K2	Acetanilid	7,907	7,666	8,147	0,672	8,501	0,45183
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,028	3,970	4,086	0,162	4,030	0,02635
	P	Acetanilid	3,630	3,241	4,018	1,087	29,941	1,18103
		Acetanilid	2,986	2,739	3,234	0,691	23,142	0,47766
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	7,264	6,213	8,314	2,570	35,380	6,60410
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	143,701	121,489	165,913	54,351	37,822	2953,98129
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	19,823	18,911	20,736	2,233	11,265	4,98699



## 9.10.2 Ovalbumin pH 6,00

D1-OVA-150505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,51	5,00	6,673	6,130	0,829
Neostigmin	22,82	5,00	15,053	13,827	4,192
Ovalbumin	48,58	10,0	0,227	0,209	8,925

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,00	640,93	51,69	4,710	0,290
ist	6,00	643,63	51,37	4,729	0,289

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 4500,00 mg/500,0ml

ist: 4500,93 mg/500,0ml

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	7.00	47
P Protein	30	12	30	25	20.00	47
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	20.00	47

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,970	2,949	2,992	0,060	2,026	0,00362
	P	Neostigmin	2,867	2,762	2,972	0,293	10,225	0,08594
	K2	Neostigmin	3,265	3,167	3,363	0,275	8,414	0,07547
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	59,424	58,809	60,038	1,716	2,888	2,94611
	P	Neostigmin	56,849	54,817	58,880	5,677	9,987	32,23262
	K2	Neostigmin	70,099	67,883	72,314	6,191	8,832	38,32821
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	20,009	19,818	20,200	0,534	2,671	0,28553
	P	Neostigmin	19,837	19,665	20,010	0,482	2,430	0,23241
	K2	Neostigmin	21,469	21,275	21,663	0,542	2,523	0,29331
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	5,218	5,163	5,273	0,153	2,930	0,02338
	P	Acetanilid	4,996	4,616	5,377	1,063	21,279	1,13041
	K2	Acetanilid	6,289	5,891	6,688	1,113	17,698	1,23901
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	44,701	43,990	45,411	1,986	4,442	3,94249
	P	Acetanilid	42,607	39,255	45,958	9,366	21,983	87,72581
	K2	Acetanilid	57,291	53,448	61,134	10,740	18,746	115,34851
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	8,568	8,457	8,678	0,309	3,608	0,09558
	P	Acetanilid	8,521	8,412	8,631	0,307	3,597	0,09398
	K2	Acetanilid	9,100	9,002	9,198	0,274	3,014	0,07521
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	3,683	3,644	3,721	0,107	2,917	0,01154
	P	Acetanilid	3,964	3,750	4,178	0,598	15,082	0,35743
		Acetanilid	3,137	2,958	3,316	0,501	15,962	0,25076
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	7,939	6,881	8,996	2,955	37,223	8,73235
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	180,697	160,336	201,058	56,900	31,489	3237,60243
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	24,691	22,378	27,004	6,464	26,178	41,77851

## 9.10.3 Ovalbumin pH 6,50

D-OVAL-131004	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	8,71	10,0	6,444	5,919	0,800
Neostigmin	50,49	10,0	16,652	15,296	4,638
Ovalbumin	33,18	10,0	0,155	0,143	6,096

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup> 0,5 l					
soll	6,50	2847,11	726,06	20,921	4,079
ist	6,50	2847,96	726,72	20,927	4,083

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 900,00 mg/100,0ml und 450,00 mg/50,0ml  
 ist: 900,53 mg/100,0ml und 450,39 mg/50,0ml

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
RWI 01A	46-50	363-369	60	48

		Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	t [min]	I [μA]
K1	Kontrolle 1	30	12	30	25	6.00	56
P	Protein	30	12	30	25	20.00	56
K2	Kontrolle 2	17	12	30	25	45.00	56

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Neostigmin	2,448	2,439	2,456	0,023	0,949	0,00054
	P	Neostigmin	2,452	2,421	2,483	0,087	3,531	0,00750
	K2	Neostigmin	2,463	2,444	2,481	0,039	1,571	0,00150
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	51,642	51,383	51,900	0,723	1,400	0,52296
	P	Neostigmin	39,946	35,562	44,330	12,251	30,668	150,08500
	K2	Neostigmin	46,814	39,962	53,666	14,414	30,790	207,76023
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	21,100	21,028	21,171	0,199	0,941	0,03942
	P	Neostigmin	16,334	14,573	18,094	4,921	30,129	24,21783
	K2	Neostigmin	19,058	16,161	21,955	6,095	31,981	37,14697
t <sub>Mig</sub> [min]	K1	Acetanilid	3,816	3,800	3,832	0,045	1,173	0,00200
	P	Acetanilid	3,783	3,744	3,822	0,109	2,874	0,01182
	K2	Acetanilid	3,840	3,812	3,867	0,059	1,533	0,00346
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	26,430	26,292	26,568	0,385	1,457	0,14830
	P	Acetanilid	19,389	17,967	20,812	3,975	20,501	15,79998
	K2	Acetanilid	23,995	20,360	27,630	7,646	31,867	58,46879
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	6,926	6,904	6,949	0,063	0,903	0,00391
	P	Acetanilid	5,118	4,761	5,475	0,997	19,482	0,99416
	K2	Acetanilid	6,259	5,284	7,233	2,050	32,749	4,20103
EOF [10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	K1	Acetanilid	5,032	5,011	5,053	0,059	1,168	0,00345
	P	Acetanilid	5,079	5,026	5,132	0,147	2,892	0,02158
	K2	Acetanilid	5,002	4,965	5,038	0,077	1,538	0,00592
t <sub>Mig</sub> [min]		Ovalbumin	5,554	5,493	5,615	0,165	2,976	0,02733
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	37,821	29,752	45,891	21,787	57,604	474,65546
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	6,798	5,339	8,258	3,940	57,962	15,52627

### 9.10.4 Ovalbumin pH 6,50

D2-OVA-150505	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 6,50	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	4,51	5,00	6,673	6,130	0,829
Neostigmin	22,82	5,00	15,053	13,827	4,192
Ovalbumin	48,58	10,0	0,227	0,209	8,925

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
50 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	6,50	569,42	145,21	4,184	0,816
ist	6,50	569,17	145,06	4,182	0,815

NaCl-Lsg 154 mmol·ml<sup>-1</sup> soll: 4500,00 mg/500,0ml  
 ist: 4500,93 mg/500,0ml

## 9 Ergebnisübersicht der Versuche zur CZE mit Proteinen

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	$L_{\text{ges}}$ [cm]	$L_{\text{Det}}$ [cm]
DRR 05A	51	360	60	48

	Läufe	$t_{\text{Inj}}$ [s]	$p_{\text{Inj}}$ [mbar]	U [kV]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	30	12	30	25	7.00	59
P Protein	30	12	30	25	20.00	59
K2 Kontrolle 2	30	12	30	25	20.00	59

Substanz			$\bar{x}$	$\theta$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Neostigmin	2,682	2,678	2,687	0,013	0,487	0,00017
	P	Neostigmin	2,682	2,679	2,684	0,008	0,307	0,00007
	K2	Neostigmin	2,655	2,649	2,661	0,016	0,604	0,00026
Fläche [AU·min]	K1	Neostigmin	50,464	50,179	50,749	0,796	1,578	0,63424
	P	Neostigmin	50,302	50,020	50,584	0,788	1,567	0,62104
	K2	Neostigmin	49,423	49,272	49,573	0,420	0,849	0,17619
korr. Fläche [AU]	K1	Neostigmin	18,813	18,716	18,909	0,269	1,429	0,07225
	P	Neostigmin	18,758	18,660	18,857	0,275	1,464	0,07544
	K2	Neostigmin	18,614	18,570	18,658	0,122	0,657	0,01497
$t_{\text{Mig}}$ [min]	K1	Acetanilid	4,373	4,362	4,384	0,030	0,689	0,00091
	P	Acetanilid	4,365	4,360	4,370	0,014	0,325	0,00020
	K2	Acetanilid	4,305	4,294	4,316	0,031	0,722	0,00097
Fläche [AU·min]	K1	Acetanilid	35,140	34,929	35,351	0,590	1,678	0,34774
	P	Acetanilid	34,935	34,774	35,096	0,451	1,290	0,20317
	K2	Acetanilid	34,078	33,936	34,220	0,398	1,167	0,15816
korr. Fläche [AU]	K1	Acetanilid	8,035	7,997	8,073	0,105	1,310	0,01107
	P	Acetanilid	8,003	7,970	8,037	0,094	1,177	0,00887
	K2	Acetanilid	7,916	7,896	7,937	0,057	0,723	0,00327
EOF [ $10^{-4}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	K1	Acetanilid	4,391	4,380	4,401	0,030	0,682	0,00090
	P	Acetanilid	4,399	4,393	4,404	0,014	0,327	0,00021
		Acetanilid	4,460	4,449	4,472	0,032	0,721	0,00103
$t_{\text{Mig}}$ [min]		Ovalbumin	6,715	6,705	6,725	0,028	0,411	0,00076
Fläche [AU·min]		Ovalbumin	183,888	145,713	222,063	106,681	58,014	11380,8567
korr. Fläche [AU]		Ovalbumin	27,396	21,683	33,109	15,965	58,274	254,87961

## 9.11 EOF Untersuchung in LPA beschichteten Kapillaren

### 9.11.1 Test 1 pH 7,00

LPA-170804	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	50,40	50,0	1,491	13,258	1,792
Neostigmin	50,30	10,0	3,318	29,494	8,943
Nicotinsäure	150,20	50,0	4,881	43,385	5,341

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
25 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	210,460	169,720	1,546	0,954
ist	7,00	210,800	171,160	1,549	0,962

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>sepa</sub> [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	10	18	30	23	0	45.00	84
P Protein	25	18	30	23	30	12.00	84
K2 Kontrolle 2	25	18	30	23	30	12.00	84

Substanz		$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Neostigmin							
t <sub>Mig</sub> [min]	0 mbar	6,970	6,829	7,111	0,228	3,269	0,05192
Fläche [AU·min]	0 mbar	440,112	380,995	499,230	95,382	21,672	9097,78638
korr. Fläche [AU]	0 mbar	62,954	55,437	70,471	12,129	19,266	147,10752
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar	2,033	2,022	2,043	0,027	1,338	0,00074
Fläche [AU·min]	25 mbar	141,100	138,852	143,348	5,734	4,064	32,88290
korr. Fläche [AU]	25 mbar	69,453	68,126	70,779	3,384	4,873	11,45276
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar	2,106	2,095	2,116	0,026	1,252	0,00070
Fläche [AU·min]	40 mbar	134,675	133,976	135,374	1,784	1,324	3,18171
korr. Fläche [AU]	40 mbar	63,968	63,552	64,384	1,061	1,659	1,12609
Acetanilid							
	0 mbar	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar	3,010	2,994	3,026	0,040	1,343	0,00163
Fläche [AU·min]	25 mbar	88,514	86,384	90,644	5,435	6,140	29,53566
korr. Fläche [AU]	25 mbar	29,430	28,620	30,241	2,068	7,026	4,27516
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	25 mbar	6,806	6,765	6,846	0,104	1,528	0,01081
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar	3,106	3,094	3,118	0,031	1,006	0,00098
Fläche [AU·min]	40 mbar	83,557	82,494	84,620	2,712	3,246	7,35628
korr. Fläche [AU]	40 mbar	26,904	26,525	27,284	0,969	3,602	0,93920
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	40 mbar	6,558	6,527	6,589	0,079	1,198	0,00617
Nicotinsäure							
	0 mbar	-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar	8,309	8,249	8,370	0,155	1,861	0,02391
Fläche [AU·min]	25 mbar	603,401	594,137	612,665	23,634	3,917	558,55527
korr. Fläche [AU]	25 mbar	72,617	71,641	73,594	2,490	3,430	6,20220
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar	8,374	8,346	8,402	0,071	0,847	0,00503
Fläche [AU·min]	40 mbar	540,541	535,629	545,453	12,531	2,318	157,02357
korr. Fläche [AU]	40 mbar	64,562	63,842	65,282	1,838	2,846	3,37673

## 9.11.2 Test 2 pH 7,00

LPA-200804	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C Probe	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	9,47	10,0	14,910	12,456	1,684
Neostigmin	52,29	10,0	34,492	30,661	9,296

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
25 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	210,460	169,720	1,546	0,954
ist	7,00	210,800	171,16	1,549	0,962

Kapillarcharge	I.D. [ $\mu\text{m}$ ]	O.D. [ $\mu\text{m}$ ]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>sepa</sub> [mbar]	t [min]	I [ $\mu\text{A}$ ]
K1 Kontrolle 1	10	12	30	20	0	45.00	84
K2 Kontrolle 2	20	12	30	23	25	20.00	84
K3 Kontrolle 3	20	12	30	23	25	20.00	84
K4 Kontrolle 4	20	12	30	23	25	20.00	84
K5 Kontrolle 5	20	12	30	23	25	20.00	84
K6 Kontrolle 6	9	12	30	23	25	20.00	84

Neostigmin	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Kontrolle 2	3,172	3,129	3,216	0,099	3,124	0,00982
	Kontrolle 3	3,278	3,260	3,296	0,042	1,286	0,00178
	Kontrolle 4	3,253	3,204	3,302	0,112	3,445	0,01256
	Kontrolle 5	3,250	3,241	3,260	0,021	0,660	0,00046
	Kontrolle 6	3,254	3,241	3,267	0,021	0,631	0,00000
Fläche [AU·min]	Kontrolle 2	199,174	188,515	209,834	24,321	12,211	591,52937
	Kontrolle 3	307,091	294,424	319,757	28,902	9,412	835,32573
	Kontrolle 4	314,036	310,234	317,837	8,674	2,762	75,23523
	Kontrolle 5	273,983	269,692	278,275	9,792	3,574	95,87676
	Kontrolle 6	250,565	247,129	254,000	5,258	2,099	27,64927
korr. Fläche [AU]	Kontrolle 2	62,711	59,732	65,690	6,798	10,840	46,20974
	Kontrolle 3	93,763	89,588	97,938	9,526	10,160	90,74832
	Kontrolle 4	96,571	95,673	97,469	2,048	2,121	4,19614
	Kontrolle 5	84,308	82,809	85,806	3,419	4,055	11,68934
	Kontrolle 6	76,997	76,100	77,895	1,373	1,783	1,88568

Acetanilid	Substanz	$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
t <sub>Mig</sub> [min]	Kontrolle 2	5,465	5,338	5,591	0,289	5,289	0,08354
	Kontrolle 3	5,885	5,838	5,933	0,109	1,848	0,01182
	Kontrolle 4	5,822	5,596	6,048	0,516	8,866	0,26644
	Kontrolle 5	5,581	5,568	5,594	0,029	0,523	0,00085
	Kontrolle 6	5,564	5,543	5,584	0,031	0,564	0,00100
Fläche [AU·min]	Kontrolle 2	131,223	123,855	138,592	16,814	12,813	282,70088
	Kontrolle 3	222,567	212,643	232,491	22,644	10,174	512,73516
	Kontrolle 4	229,446	219,029	239,863	23,769	10,359	564,97381
	Kontrolle 5	188,502	185,820	191,184	6,119	3,246	37,44368
	Kontrolle 6	169,377	166,586	172,168	4,272	2,522	18,24686
korr. Fläche [AU]	Kontrolle 2	23,980	22,857	25,104	2,564	10,693	6,57519
	Kontrolle 3	37,851	36,068	39,633	4,068	10,747	16,54563
	Kontrolle 4	39,375	38,979	39,770	0,903	2,294	0,81619
	Kontrolle 5	33,780	33,262	34,299	1,183	3,503	1,40065
	Kontrolle 6	30,442	29,999	30,885	0,678	2,228	0,46000
EOF [ $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	Kontrolle 2	3,429	3,328	3,530	0,230	6,719	0,05308
	Kontrolle 3	3,105	3,071	3,138	0,076	2,442	0,00575
	Kontrolle 4	3,175	3,033	3,317	0,324	10,192	0,10471
	Kontrolle 5	3,326	3,316	3,336	0,023	0,678	0,00051
	Kontrolle 6	3,339	3,323	3,355	0,024	0,726	0,00059

## 9.11.3 Test 3 pH 7,00

LPA-230804	Einwaage	V <sub>int. Sta.</sub>	C <sub>Probe</sub>	n <sub>Inject</sub>	m <sub>Inject</sub>
pH 7,00	[mg]	[ml]	[μmol·ml <sup>-1</sup> ]	[pmol]	[ng]
Acetanilid	10,50	10,0	15,536	13,810	1,867
Neostigmin	49,60	10,0	32,72	29,084	8,818
Nicotinsäure	9,95	10,0	16,166	43,385	1,769

Phosphat-Puffer	pH	m [mg] KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	m [mg] Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	n [mmol] H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	n [mmol] HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
25 mmol · l <sup>-1</sup>					
soll	7,00	210,460	169,720	1,546	0,954
ist	7,00	210,800	171,16	1,549	0,962

Kapillarcharge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	L <sub>ges</sub> [cm]	L <sub>Det</sub> [cm]
LVF 03M	50	260	62	48

	Läufe	t <sub>Inj</sub> [s]	p <sub>Inj</sub> [mbar]	U [kV]	p <sub>sepa</sub> [mbar]	t [min]	I [μA]
K1 Kontrolle 1	10	12	30	15	0	60.00	84
K2 Kontrolle 2	20	12	30	15	25	30.00	84
K3 Kontrolle 3	20	12	30	15	40	30.00	84
K4 Kontrolle 4	1	30 min	700	0	0	30.00	0
K5 Kontrolle 5	20	12	30	15	25	30.00	0
K6 Kontrolle 6	20	12	30	15	40	30.00	0

Substanz			$\bar{x}$	$\underline{\theta}$	$\bar{\theta}$	$\hat{\sigma}$	RSD %	$\hat{\sigma}^2$
Neostigmin								
t <sub>Mig</sub> [min]	0 mbar		6,318	6,238	6,397	0,128	2,030	0,01645
Fläche [AU·min]	0 mbar		256,194	236,068	276,320	32,472	12,675	1054,43712
korr. Fläche [AU]	0 mbar		40,640	37,056	44,224	5,783	14,231	33,44621
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar		3,444	3,396	3,493	0,111	3,229	0,01237
Fläche [AU·min]	25 mbar		82,325	77,672	86,978	10,617	12,896	112,71552
korr. Fläche [AU]	25 mbar		24,007	22,348	25,666	3,785	15,767	14,32865
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar		3,520	3,290	3,751	0,527	14,964	0,27752
Fläche [AU·min]	40 mbar		37,851	33,871	41,831	9,082	23,993	82,47679
korr. Fläche [AU]	40 mbar		11,321	9,450	13,191	4,268	37,703	18,21813
Acetanilid								
t <sub>Mig</sub> [min]	0 mbar		13,362	12,472	14,253	1,507	11,279	2,27200
Fläche [AU·min]	0 mbar		209,124	192,553	225,694	28,040	13,408	786,24099
korr. Fläche [AU]	0 mbar		15,823	14,326	17,319	2,533	16,007	6,41474
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	0 mbar		2,318	2,287	2,350	0,051	2,206	0,00262
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar		4,797	4,701	4,893	0,219	4,557	0,04780
Fläche [AU·min]	25 mbar		42,646	40,166	45,127	5,659	13,271	32,02901
korr. Fläche [AU]	25 mbar		8,943	8,289	9,597	1,492	16,680	2,22533
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	25 mbar		5,384	5,252	5,517	0,302	5,608	0,09117
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar		4,963	4,514	5,413	1,026	20,665	1,05204
Fläche [AU·min]	40 mbar		18,140	16,045	20,235	4,780	26,351	22,84827
korr. Fläche [AU]	40 mbar		3,938	3,214	4,661	1,651	41,919	2,72445
EOF [10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	40 mbar		4,624	4,038	5,210	1,337	28,913	1,78727
Nicotinsäure								
t <sub>Mig</sub> [min]	0 mbar		-	-	-	-	-	-
Fläche [AU·min]	0 mbar		-	-	-	-	-	-
korr. Fläche [AU]	0 mbar		-	-	-	-	-	-
t <sub>Mig</sub> [min]	25 mbar		9,588	9,149	10,026	1,001	10,438	1,00159
Fläche [AU·min]	25 mbar		72,943	67,097	78,788	13,337	18,284	177,87663
korr. Fläche [AU]	25 mbar		7,772	6,907	8,637	1,973	25,387	3,89307
t <sub>Mig</sub> [min]	40 mbar		8,091	6,913	9,269	2,082	25,730	4,33385
Fläche [AU·min]	40 mbar		26,438	21,881	30,994	8,053	30,461	64,85635
korr. Fläche [AU]	40 mbar		3,588	2,676	4,501	1,614	44,964	2,60339

## Lebenslauf

Michael Graf, geboren am 28. September 1973 in Korbach

Eltern	Hans-Joachim Graf, Landmaschinen- und Kfz-Mechanikermeister im Ruhestand Jacqueline Graf, geb. LeChartier, Krankenschwester
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Ausbildung

---

08.1980 – 07.1984	Grundschule Marker Breite in Korbach
08.1984 – 06.1993	Gymnasium Alte Landesschule in Korbach mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
10.1993 – 09.1994	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
10.1994 – 12.1994	Grundausbildung 9./Sanitätsbatallion 5 Rennerod/Westerwald
01.1995 – 09.1995	Standortsanitätszentrum Fritzlar
10.1995 – 10.1998	Wiederaufnahme des Studiums der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
11.1998 – 04.1999	Pharmaziepraktikum / Anfertigung der Diplomarbeit im Bereich der Pharmazeutischen Chemie zum Thema „Synthese eines planar chiralen, potentiellen Antiphlogistikums und Trennung der Enantiomere zur Beurteilung möglicher Wirkungsunterschiede“ an der Philipps-Universität Marburg
05.1999 – 10.1999	Pharmaziepraktikum in der Adlerapotheke in Sachsenhausen/Waldeck
25.11.1999	Pharmazeutische Prüfung
26.11.1999	Erteilung der Approbation als Apotheker
03.12.1999	Verleihung des akademischen Grades Diplompharmazeut an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02.2000 – 09.2005	Anfertigung der Dissertation im Bereich Pharmazeutische Analytik der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zum Thema: „Analytik von Proteinen in der Kapillarelektrophorese: Untersuchung des Adsorptionsverhaltens unter Berücksichtigung statistischer Aspekte und Entwicklung anti-adhesiver Strategien“

## Beruflicher Werdegang

---

01.02.2000 – 31.08.2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; Betreuung des 1. Semester Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arzneistoffe, Hilfsstoffe und Schadstoffe (unter Einbeziehung von Arzneibuch-Methoden)“
10.2001, 09.2003 u. 09.2005	Durchführung von Praktika zur Kapillarelektrophorese im Rahmen der Weiterbildungsseminare zum Fachapotheker für Analytik durch die die Apothekerkammer Niedersachsen an der TU Braunschweig
09.2001, 09.2002, 09.2003 u. 09.2005	Organisation und Durchführung von Praktikumsveranstaltungen im Rahmen der GDCh Kurse 380/01, 380/02, 380/03 und 380/05 („Einsatz der Kapillarelektrophorese in der Arzneistoffanalytik“)